

ANA MÁRCIA DE MATOS VOLPATO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO DE *Calendula
officinalis* (ASTERACEAE) PARA SEU EMPREGO COMO
FITOTERÁPICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Química, como requisito parcial à obtenção do
título de Doutor em Ciências, área de concentração
em Química Orgânica.

Orientadora: Dr^a Ana Luisa Lacava Lordello

**CURITIBA
2005**

“Do meu telescópio, eu via Deus caminhar!
A maravilhosa disposição e harmonia do universo só pode
ter tido origem segundo o plano de um Ser que tudo sabe e tudo pode.
Isto fica sendo a minha última e mais elevada descoberta”.
(Isaac Newton)

Dedico este trabalho ao meu esposo Paulo e aos
meus filhos Guilherme e Amanda,
que são a verdadeira razão do meu viver.

AGRADECIMENTOS

À Deus

À Profa. Dra. Ana Luisa Lacava Lordello, pelos ensinamentos e eficiente orientação em todas as etapas deste trabalho;

Ao Programa de Pós Graduação do Departamento de Química da UFPR;

À Universidade Estadual de Ponta Grossa e LIMED - Laboratório Industrial de Medicamentos;

Aos colegas e amigos do LAPNEQ, que contribuíram para minha formação acadêmica;

À Audrey e Cynthia, pela amizade;

Aos funcionários do Departamento de Química por sua colaboração, em especial a Marcelino Câmara;

À CAPES que proporcionou o suporte financeiro para o desenvolvimento do trabalho;

Aos meus familiares, principalmente minha mãe Anna e meu pai Jair (*in memorian*), pelo apoio e incentivo;

A todos aqueles que de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

| | |
|---|-------|
| AGRADECIMENTOS..... | iv |
| ÍNDICE..... | v |
| LISTA DE TABELAS..... | x |
| LISTA DE ESQUEMAS..... | xiii |
| LISTA DE FIGURAS..... | xiv |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | xviii |
| RESUMO..... | xix |
| ABSTRACT..... | xxi |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1. LEGISLAÇÃO BRASILEIRA SOBRE FITOTERÁPICOS..... | 5 |
| 1.2 INVESTIGAÇÃO BIOMONITORADA DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE PLANTAS MEDICINAIS..... | 6 |
| 1.3 MECANISMO DE AÇÃO DOS ANTIMICROBIANOS..... | 6 |
| 1.3.1 SELEÇÃO DOS MICROORGANISMOS..... | 7 |
| 1.3.2 TÉCNICAS EMPREGADAS..... | 8 |
| 1.3.3 PLANTAS MEDICINAIS COM POTENCIAL ANTIMICROBIANO..... | 9 |
| 1.4 TOXICOLOGIA DE PLANTAS MEDICINAIS..... | 14 |
| 1.5 AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS MUTAGÊNICOS..... | 16 |
| 1.5.1 INVESTIGAÇÃO DA MUTAGÊNESE PELO TESTE DE MICRONÚCLEOS..... | 17 |
| 1.5.2 INVESTIGAÇÃO DA MUTAGÊNESE PELO TESTE DE AMES..... | 18 |
| 1.6 COMPOSTOS DA CLASSE DOS TRITERPENOS..... | 18 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 23 |
| 2.1 POSIÇÃO TAXONÔMICA..... | 23 |
| 2.2 SINOPSE DA FAMÍLIA ASTERACEAE..... | 23 |
| 2.3 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O GÊNERO CALENDULA.... | 24 |
| 2.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE A <i>Calendula officinalis</i> L..... | 25 |
| 2.4.1 NOMES POPULARES..... | 25 |
| 2.4.2 HÁBITO..... | 26 |
| 2.4.3 CARACTERÍSTICAS BOTÂNICAS GERAIS..... | 26 |

| | | |
|---------|--|----|
| 2.4.4 | CARACTERÍSTICAS DE CULTIVO..... | 27 |
| 2.4.5 | CARACTERÍSTICAS FARMACOGNÓSTICAS..... | 28 |
| 2.4.5.1 | DESCRIÇÃO MACROSCÓPICA DAS FLORES..... | 28 |
| 2.4.5.2 | DESCRIÇÃO MICROSCÓPICA DAS FLORES..... | 28 |
| 2.4.6 | CONSTITUIÇÃO QUÍMICA DE <i>Calendula officinalis</i> | 28 |
| 2.4.7 | ASPÉCTOS FARMACOLÓGICOS DE <i>Calendula officinalis</i> | 35 |
| 2.4.7.1 | USO NA MEDICINA TRADICIONAL | 35 |
| 2.4.7.2 | ESTUDOS FARMACOLÓGICOS EXPERIMENTAIS | 36 |
| 2.4.8 | COMPOSTOS QUÍMICOS ISOLADOS DE <i>Calendula officinalis</i> E SUA ATIVIDADE BIOLÓGICA | 37 |
| 3 | OBJETIVOS..... | 39 |
| 3.1 | GERAL..... | 39 |
| 3.2 | ESPECÍFICOS..... | 39 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 40 |
| 4.1 | ESPECIFICAÇÃO DOS EQUIPAMENTOS E MATERIAIS UTILIZADOS..... | 40 |
| 4.2 | MATERIAL VEGETAL..... | 41 |
| 4.2.1 | IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA | 41 |
| 4.2.2 | IDENTIFICAÇÃO MICROSCÓPICA DA PLANTA | 41 |
| 4.2.3 | AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DA PLANTA | 41 |
| 4.2.3.1 | DENSIDADE APARENTE | 41 |
| 4.2.3.2 | DETERMINAÇÃO GRANULOMÉTRICA | 42 |
| 4.2.3.3 | DETERMINAÇÃO DE VOLÁTEIS | 42 |
| 4.2.3.4 | DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁGUA | 42 |
| 4.2.3.5 | DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CINZAS | 42 |
| 4.3 | CEPAS DE MICROORGANISMOS | 42 |
| 4.4 | INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA | 43 |
| 4.5 | OBTENÇÃO E FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS..... | 44 |
| 4.5.1 | EXTRATO A | 44 |
| 4.5.2 | EXTRATO B | 44 |
| 4.5.3 | FRACIONAMENTO DA SUB-FRAÇÃO APOLAR (HEX-DCM) | 45 |
| 4.5.3.1 | FRACIONAMENTO DA SUB-FRAÇÃO APOLAR (AP-ACOET) | 46 |

| | |
|--|----|
| 4.5.3.2. FRACIONAMENTO DA SUB-FRAÇÃO APOLAR (AP-MEOH) | 47 |
| 4.6 ANÁLISE COMPARATIVA DE DIFERENTES TÉCNICAS EXTRATIVAS..... | 48 |
| 4.6.1 PREPARO DOS EXTRATOS | 48 |
| 4.6.2 ANÁLISE DO RENDIMENTO DOS EXTRATOS BRUTOS | 48 |
| 4.6.3 INVESTIGAÇÃO DO PERFIL DE SENSIBILIDADE FRENTE AOS PROCESSOS DE EXTRAÇÃO | 49 |
| 4.6.4 AVALIAÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS PROCESSOS EXTRATIVOS | 49 |
| 4.6.5 ANÁLISE QUANTITATIVA DOS COMPOSTOS ISOLADOS POR CG-MS | 49 |
| 4.6.5.1. CURVA DE CALIBRAÇÃO DO ESTIGMASTEROL | 50 |
| 4.6.5.2. ANÁLISE QUANTITATIVA DO β -SITOSTEROL | 51 |
| 4.7 AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE QUÍMICA PELO CONTROLE SAZONAL ... | 52 |
| 4.7.1 ANÁLISE DO RENDIMENTO DOS EXTRATOS BRUTOS | 52 |
| 4.7.2 INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL DE SENSIBILIDADE FRENTE AOS PROCESSOS DE EXTRAÇÃO | 52 |
| 4.7.3 ANÁLISE QUALITATIVA DO PERFIL CROMATOGRÁFICO POR MEIO DE CLAE | 53 |
| 4.8 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TOXICOLÓGICO E MUTAGÊNICO | 53 |
| 4.8.1 POTENCIAL TOXICOLÓGICO | 53 |
| 4.8.2 POTENCIAL MUTAGÊNICO | 54 |
| 4.8.2.1 TESTE DO MICRONÚCLEO | 54 |
| 4.8.2.1.1 ENSAIO AGUDO | 54 |
| 4.8.2.1.2 ENSAIO SUB-AGUDO | 54 |
| 4.8.2.2 TESTE DE AMES | 54 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 56 |
| 5.1 ANÁLISES PRELIMINARES | 56 |
| 5.1.1 ANÁLISES MACRO E MICROSCÓPICAS | 56 |
| 5.1.2. AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DO MATERIA VEGETAL | 56 |
| 5.1.2.1 DENSIDADE APARENTE | 56 |

| | |
|---|----|
| 5.1.2.2 DETERMINAÇÃO GRANULOMÉTRICA | 57 |
| 5.1.2.3 DETERMINAÇÃO DE VOLÁTEIS | 57 |
| 5.1.2.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁGUA | 57 |
| 5.1.2.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CINZAS | 58 |
| 5.2 INVESTIGAÇÃO DO GRAU DE SENSIBILIDADE DOS EXTRATOS DE <i>C. officinalis</i> FRENTE A CEPAS PATOGÊNICAS | 58 |
| 5.3. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS ISOLADOS | 60 |
| 5.4 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SENSIBILIDADE PARA AS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS E IDENTIFICADAS | 70 |
| 5.5 COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS EXTRATIVAS | 72 |
| 5.5.1 ANÁLISE DO RENDIMENTO DO EXTRATO BRUTO | 72 |
| 5.5.2 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA | 73 |
| 5.5.3. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA EM CLAE | 73 |
| 5.5.4. ANÁLISE QUANTITATIVA DOS COMPOSTOS ISOLADOS POR MEIO DE CG-MS | 76 |
| 5.5.4.1 COMPARAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO COMPOSTO ESTIGMASTEROL NOS PROCESSOS DE EXTRAÇÃO PERCOLAÇÃO, AGITAÇÃO EM VORTEX E SONICAÇÃO | 78 |
| 5.5.4.2 COMPARAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO COMPOSTO β -SITOSTEROL NOS PROCESSOS DE EXTRAÇÃO PERCOLAÇÃO, AGITAÇÃO EM VORTEX E SONICAÇÃO | 78 |
| 5.6. CONTROLE DA VARIAÇÃO SAZONAL | 79 |
| 5.6.1. AVALIAÇÃO DO RENDIMENTO OBTIDO NO PROCESSO DE EXTRAÇÃO | 80 |
| 5.6.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA | 80 |
| 5.6.3 AVALIAÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO EM CLAE | 81 |
| 5.7 INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL TOXICOLÓGICO..... | 82 |
| 5.7.1 TOXICIDADE VIA ORAL | 82 |
| 5.7.2 TOXICIDADE VIA INTRA-PERITONEAL | 82 |
| 5.8 INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO..... | 83 |
| 5.8.1 TESTE DO MICRONÚCLEO | 83 |

| | |
|---|-----|
| 5.8.1.1 ESTUDO AGUDO | 83 |
| 5.8.1.1.1 ADMINISTRAÇÃO VIA ORAL | 84 |
| 5.8.1.1.2 ADMINISTRAÇÃO VIA INTRA-PERITONEAL | 84 |
| 5.8.1.2. ESTUDO SUB-AGUDO | 84 |
| 5.8.1.2.1 ADMINISTRAÇÃO VIA ORAL | 85 |
| 5.8.1.2.2. ADMINISTRAÇÃO VIA INTRA-PERITONEAL | 54 |
| 5.8.2. TESTE DE AMES FRENTE À <i>Salmonella typhimurium</i> | 85 |
| 6 CONCLUSÕES..... | 87 |
| 7 REFERÊNCIAS..... | 89 |
| 8 ANEXOS..... | 105 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| TABELA 1: CLASSES DE COMPOSTOS ORIGINADOS DE PLANTAS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA | 10 |
| TABELA 2: VALORES CARACTERÍSTICOS DE RMN ^{13}C (PPM, CDCl_3) DOS ÁTOMOS DE CARBONO na função Oxigenada | 22 |
| TABELA 3: VALORES CARACTERÍSTICOS DE RMN ^{13}C DE CARBONOS SP^2 EM TRITERPENOS | 22 |
| TABELA 4: ATIVIDADE FARMACOLÓGICA RELACIONADA AO COMPOSTO QUÍMICO OU CLASSE DE COMPOSTOS ISOLADOS DE <i>C. officinalis</i> | 38 |
| TABELA 5: SISTEMA DE ELUIÇÃO PARA ANÁLISE EM CLAE DOS PROCESSOS DE EXTRAÇÃO | 49 |
| TABELA 6: ÁREA OBTIDA PARA OS ESTERÓIDES ESTIGMASTEROL E β -SITOSTEROL, PARA OS PROCESSOS DE EXTRAÇÃO PERCOLAÇÃO, AGITAÇÃO EM VORTEX E SONICAÇÃO | 50 |
| TABELA 7: RELAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO DO ESTIGMASTEROL E A AREA DO PICO | 50 |
| TABELA 8: RELAÇÃO ENTRE A AREA DO PICO E A CONCENTRAÇÃO | 51 |
| TABELA 9: SISTEMA DE ELUIÇÃO PARA ANÁLISE EM CLAE NO CONTROLE SAZONAL (DOZE MESES DO ANO) | 53 |
| TABELA 10: DENSIDADE APARENTE REALIZADA EM TRIPLICATA | 56 |
| TABELA 11: DETERMINAÇÃO DA GRANULOMETRIA DA DROGA | 57 |
| TABELA 12: PERDA DA DROGA REALIZADA EM BALANÇA DE INFRAVERMELHO EM DOIS PATAMARES DE TEMPERATURA | 57 |
| 57TABELA 13: DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁGUA NA DROGA POR KARL FISHER | 57 |
| TABELA 14: DETERMINAÇÃO GRAVIMÉTRICA DA PERDA DA DROGA REALIZADA EM MUFLA COM CINCO PATAMARES DE TEMPERATURA | 58 |
| TABELA 15: AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DAS FRAÇÕES DE <i>C. officinalis</i> (TECNICA CAVIDADE PLACA) | 59 |

| | |
|---|----|
| TABELA 16: AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DAS FRAÇÕES DE <i>C. officinalis</i> (TECNICA CILINDRO EM PLACAS) | 59 |
| TABELA 17: AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DAS SUB-FRAÇÕES APOLARES DE <i>C. officinalis</i> | 60 |
| TABELA 18: DADOS DE δ OBTIDOS A PARTIR DE ESPECTRO DE RMN ^{13}C DO COMPOSTO <u>1</u> (β -SITOSTEROL) (CDCl_3 50MHz) | 62 |
| TABELA 19: DADOS DE δ OBTIDOS A PARTIR DE ESPECTRO DE RMN ^{13}C DO COMPOSTO <u>2</u> (ESTIGMASTEROL) (CDCl_3 50MHz) | 63 |
| TABELA 20: DADOS DE δ OBTIDOS A PARTIR DE ESPECTRO DE RMN ^{13}C DO COMPOSTO <u>3</u> (α -AMIRINA) (CDCl_3 50MHz) | 64 |
| TABELA 21: DADOS DE δ OBTIDOS A PARTIR DE ESPECTRO DE RMN ^{13}C DO COMPOSTO <u>3</u> (α E β AMIRINA) (CDCl_3 50MHz) | 66 |
| TABELA 22: DADOS DE δ OBTIDOS A PARTIR DE ESPECTRO DE RMN ^{13}C DO COMPOSTO PALMITATO DE FARADIOILA (CDCl_3 50MHz) | 68 |
| TABELA 23: DADOS DE δ OBTIDOS A PARTIR DE ESPECTRO DE RMN ^{13}C DA SUBSTÂNCIA <u>6</u> (LUPEOL) (CDCl_3 50MHz) | 69 |
| TABELA 24: ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS COMPOSTOS ISOLADOS DE <i>Calendula officinalis</i> EXPRESSADOS EM MIC ($\mu\text{g/mL}$) | 70 |
| TABELA 25: PERFIL DE SENSIBILIDADE DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÃO APOLAR ATIVA DE <i>C. officinalis</i> FRENTE A CEPAS PADRÃO E MULTIRRESISTENTE DE <i>Staphylococcus aureus</i> (MÉTODO CILINDRO-PLACA) | 72 |
| TABELA 26: AVALIAÇÃO DAS PORCENTAGENS DE RENDIMENTO DOS PROCESSOS DE EXTRAÇÃO | 72 |
| TABELA 27: avaliação da sensibilidade das frações de <i>C. officinalis</i> (TECNICA CAVIDADE PLACA)..... | 73 |
| TABELA 28: Comparação da concentração do Estigmasterol nos processos de extração nas flores de <i>C. officinalis</i> | 78 |
| TABELA 29: COMPARAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO SITOSTEROL NOS PROCESSOS DE EXTRAÇÃO NAS FLORES DE <i>C. officinalis</i> | 79 |
| TABELA 30: AVALIAÇÃO DO RENDIMENTO OBTIDO PARA O EXTRATO BRUTO DE <i>C. officinalis</i> NOS DOZE MESES DO ANO..... | 80 |

| | |
|---|----|
| TABELA 31: AVALIAÇÃO DE SENSIBILIDADE DA VARIAÇÃO SAZONAL DE FLORES DE <i>C. OFFICINALIS</i> COLETADAS NOS MESES DO ANO UTILIZANDO-SE 3.000 μ G/POÇO (MÉTODO DE DIFUSÃO RADIAL EM ÁGAR-CAVIDADE) | 81 |
| TABELA 32: ÍNDICES DE MORTALIDADE | 83 |
| TABELA 33 : AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO MUTAGÊNICO DO EXTRATO BRUTO DE <i>C. officinalis</i> Frente A Cepa TA 100 (<i>Salmonella typhimurium</i>)..... | 86 |

LISTA DE ESQUEMAS

| | |
|---|----|
| ESQUEMA 1: PROCESSO DE EXTRAÇÃO REALIZADO POR SOXHLET E SUB-FRACIONAMENTO POR COLUNA FILTRANTE DAS FRAÇÕES HEXÂNICA E DICLOROMETANO | 45 |
| ESQUEMA 2: FRACIONAMENTO PARCIAL DA FRAÇÃO APOLAR ACETATO DE ETILA (AP/AcOEt) | 46 |
| ESQUEMA 3: FRACIONAMENTO PARCIAL DA FRAÇÃO APOLAR METANÓLICA (Ap/MeOH) | 47 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA 1: EXEMPLOS DE ESTRUTURAS QUÍMICAS DE COMPOSTOS ORIUNDOS DE PLANTAS MEDICINAIS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA | 14 |
| FIGURA 2: ESTRUTURA QUÍMICA DE TRITERPENOS COM ESQUELETO TETRACÍCLICO E PENTACÍCLICO | 20 |
| FIGURA 3: FOTO DA FLOR DE <i>Calendula officinalis</i> L. (ASTERACEAE) | 25 |
| FIGURA 4: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE FLAVONÓIDES ISOLADOS DE <i>C. officinalis</i> | 30 |
| FIGURA 5: COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>C. officinalis</i> | 31 |
| FIGURA 6: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS TRITERPENOS FARADIOL, TARAXASTGEROL, ψ -TARAXASTEROL, CALENDULADIOL, α E β -AMIRINA ISOLADOS DE <i>C. officinalis</i> | 33 |
| FIGURA 7: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS TRITERPENOS ARNIDIOL, LUPEOL, MIRISTATO E PALMITATO DE FARADIOL ISOLADOS DE <i>C. officinalis</i> | 34 |
| FIGURA 8: CURVA DE CALIBRAÇÃO OBTIDA PARA O ESTIGMASTEROL, ONDE (Y) É ÁREA DO PICO E (X) É CONCENTRAÇÃO EM mg/g | 51 |
| FIGURA 9: CURVA DE CALIBRAÇÃO OBTIDA PARA O β -SITOSTEROL, ONDE Y É ÁREA DO PICO E X É COCENTRAÇÃO EM mg/g | 52 |
| FIGURA 10: ESTRUTURA DA SUBSTÂNCIA 1 | 61 |
| FIGURA 11: ESTRUTURA DA SUBSTÂNCIA 2 | 62 |
| FIGURA 12: ESTRUTURA DA SUBSTÂNCIA 3 | 63 |
| FIGURA 13: ESTRUTURA DA SUBSTÂNCIA 4 | 65 |
| FIGURA 14: ESTRUTURA DA SUBSTÂNCIA 5 | 67 |
| FIGURA 15: ESTRUTURA DA SUBSTÂNCIA 6 | 68 |
| FIGURA 16: AVALIAÇÃO DA ABSORTIVIDADE DA TINTURA FRENTE EM ESPECTROFOTÔMETRO (A) E ATRAVÉS DE CLAE NOS COMPRIMENTOS DE ONDA (λ) EM 215NM (1); 232NM (2); 274NM (3) E 430NM (4) (B). (CLAE: EIXO Y= ABSORBÂNCIA/EIXO X=TEMPO DE RETENÇÃO) | 75 |

| | |
|--|-----|
| FIGURA 17: ESTUDO COMPARATIVO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO POR CLAE ENTRE OS PROCESSOS DE EXTRAÇÃO (EIXO Y= ABSORBÂNCIA / EIXO X= TEMPO DE RETENÇÃO) | 75 |
| FIGURA 18: CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG DO EXTRATO DE PERCOLAÇÃO..... | 76 |
| FIGURA 19: CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG DO EXTRATO OBTIDO POR AGITAÇÃO EM VORTEX..... | 77 |
| FIGURA 20: CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG DO EXTRATO OBTIDO POR AGITAÇÃO EM VORTEX..... | 77 |
| FIGURA 21: CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG DO COMPOSTO ESTIGMASTEROL..... | 77 |
| FIGURA 22: CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG DO COMPOSTO β -SITOSTEROL..... | 78 |
| FIGURA 23: AVALIAÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DA TINTURA NOS DOZE MESES DO ANO (EIXO Y= ABSORBÂNCIA / EIXO X= TEMPO DE RETENÇÃO)..... | 82 |
| FIGURA 24: ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA SUBSTÂNCIA 1 (β -SITOSTEROL) – CDCl_3 ; 50MHz..... | 105 |
| FIGURA 25: ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA SUBSTÂNCIA 2 (ESTIGMASTEROL) – CDCl_3 ; 50MHz..... | 105 |
| FIGURA 26: ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA SUBSTÂNCIA 3 (α - AMIRINA) – CDCl_3 ; 50MH..... | 106 |
| FIGURA 27: ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA SUBSTÂNCIA 4 (α/β - AMIRINA) – CDCl_3 ; 50MHz..... | 106 |
| FIGURA 28: ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA SUBSTÂNCIA 5 (PALMITATO DE FARADIOILA) – CDCl_3 ; 50MHz..... | 107 |
| FIGURA 29: ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA SUBSTÂNCIA 6 (LUPEOL) – CDCl_3 ; 50MHz..... | 107 |

| | |
|--|-----|
| FIGURA 30: CROMATOGRAMA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO OBTIDO POR PERCOLAÇÃO..... | 108 |
| FIGURA 31: CROMATOGRAMA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO OBTIDO POR AGITAÇÃO EM VORTEX..... | 108 |
| FIGURA 32: CROMATOGRAMA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO OBTIDO POR SONICAÇÃO..... | 109 |
| FIGURA 33: CROMATOGRAMA DO CONTROLE SAZONAL – MES DE JANEIRO..... | 109 |
| FIGURA 34: CROMATOGRAMA DO CONTROLE SAZONAL – MES DE FEVEREIRO..... | 110 |
| FIGURA 35: CROMATOGRAMA DO CONTROLE SAZONAL – MES DE MARÇO..... | 110 |
| FIGURA 36: CROMATOGRAMA DO CONTROLE SAZONAL – MES DE ABRIL..... | 111 |
| FIGURA 37: CROMATOGRAMA DO CONTROLE SAZONAL – MES DE MAIO..... | 111 |
| FIGURA 38: CROMATOGRAMA DO CONTROLE SAZONAL – MES DE JUNHO..... | 112 |
| FIGURA 39: CROMATOGRAMA DO CONTROLE SAZONAL – MES DE JULHO..... | 112 |
| FIGURA 40: CROMATOGRAMA DO CONTROLE SAZONAL – MES DE AGOSTO..... | 113 |
| FIGURA 41: CROMATOGRAMA DO CONTROLE SAZONAL – MES DE SETEMBRO..... | 113 |
| FIGURA 42: CROMATOGRAMA DO CONTROLE SAZONAL – MES DE OUTUBRO..... | 114 |

| | |
|---|-----|
| FIGURA 43: CROMATOGRAMA DO CONTROLE SAZONAL – MES DE NOVEMBRO..... | 114 |
| FIGURA 44: CROMATOGRAMA DO CONTROLE SAZONAL – MES DE DEZEMBRO..... | 115 |
| FIGURA 45: CROMATOGRAMA DO CONTROLE SAZONAL – EXEMPLAR EGÍPCIO..... | 115 |

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOET – acetato de etila

°C – grau centígrado

CCD – cromatografia em camada delgada

CCDP – cromatografia em camada delgada preparativa

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

DMSO – dimetilsulfóxido

EtOH - etanol

g – grama

g/L – grama por litro

hex – hexano

CG-EM – cromatografia acoplada a espectrometria de massas

Hz – hertz

MeOH – metanol

MIC – concentração inibitória mínima

mg – miligrama

mL – mililitro

mm – milímetro

RMN ¹³C – ressonância nuclear magnética de Carbono-13

RMN ¹H – ressonância nuclear magnética de Hidrogênio

tr – tempo de retenção

UV – ultravioleta

$\lambda_{\text{MÁX}}$ – comprimento de onda (nm) de absorção máxima

μg/L – micrograma por litro

μL – microlitro

μm - micrometros

RESUMO

As propriedades biológicas de plantas medicinais tradicionalmente utilizadas pela população têm sido comprovadas através de intensivas pesquisas em todo o mundo, visando à validação dessas plantas como agentes clínicos em novas fitopreparações. Reconhecendo a *Calendula officinalis*, como uma das principais plantas medicinais em uso no Brasil e visando comprovar suas propriedades farmacológicas informadas na medicina tradicional, procedeu-se um estudo químico biomonitorado pela atividade antibacteriana dessa espécie. Para tanto, o estudo foi realizado nas diversas frações obtidas de suas flores (hexânica, diclorometano, acetato de etila, metanólica e etanólica 85%). O perfil de sensibilidade foi avaliado frente a microorganismos patogênicos gram positivo e negativo (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*), utilizando as metodologias de cavidade-placa e cilindro-placa. Os resultados obtidos revelaram atividade significativa frente à microorganismos gram positivos, principalmente para as frações apolares. Das sub-frações bioativas foram isolados e identificados os esteróides β -Sitosterol e Estigmasterol além dos triterpenos α -Amirina, Lupeol, mistura de β e α -amirina, e o éster palmítico do faradiol, todos já anteriormente identificados em *Calendula officinalis*. Os compostos isolados tiveram a atividade antimicrobiana avaliada nas mesmas condições anteriores, apresentando um MIC para o Lupeol de $\geq 750 \mu\text{g/mL}$ para *B. cereus*, $\geq 500 \mu\text{g/mL}$ para *M. luteus*, $\geq 500 \mu\text{g/mL}$ para *B. cereus* e para *S. aureus*. Para o β -Sitosterol o MIC foi de $\geq 250 \mu\text{g/mL}$ para *M. luteus*. Para os demais compostos o MIC foi superior a $1000 \mu\text{g} / \text{mL}$, para todos os microorganismos testados. Quando o extrato bruto e fração ativa foram testados frente a 32 cepas multirresistentes *Staphylococcus aureus*, isolados em Centros de Saúde Municipais e identificados bioquimicamente, a atividade antibacteriana foi menos expressivo em relação àquela obtida para a cepa padrão. Neste estudo foi possível observar que o grau de sensibilidade dos microorganismos para os extratos testados se equivale aos antimicrobianos padrões de Penicilina e Ampicilina. Embora a fração apolar ativa se mostrasse ligeiramente mais eficaz que o extrato bruto na inibição dos microorganismos multiresistentes, estudos estatísticos mostraram não haver significância quanto ao seu uso. Os processos tradicionalmente utilizados para a extração de plantas medicinais

tais como: percolação, sonicação e agitação em vortex, foram avaliadas de forma quantitativa, por meio de CG-MS. Os resultados demonstraram que não houve diferenças significativas na concentração dos esteróides Estigmasterol e β -Sitosterol nos processos de extração avaliados bem como no potencial antimicrobiano dos extratos testados. Embora, a administração em ratos pela via oral do extrato da planta não tenha apresentado indícios de toxicidade, a avaliação do potencial toxicológico pela via intra-peritoneal permitiu visualizar o efeito nocivo do extrato bruto das flores de *Calendula officinalis* produzido em animais de laboratório. O estudo do potencial mutagênico agudo realizado pelo teste de micronúcleos, pelas vias oral e intra-peritoneal bem como o estudo sub-agudo pela via oral, não demonstraram sinais de mutagenicidade. Porém o estudo da atividade mutagênica sub-agudo, pela via intra-peritoneal, revelou sinais de mutagenicidade para animais de laboratório. O teste de Ames não revelou mutagenicidade. O controle sazonal realizado nos doze meses do ano para o teor de sólidos totais, perfil cromatográfico em CLAE e controle da atividade antibacteriana veio de encontro aos dados da literatura, que se referem à Calêndula como sendo uma planta que pode ser coletada durante todo o ano. Quando confrontado estes dados com aqueles obtidos para a Calêndula de origem egípcia percebemos que a adaptação da planta no Brasil não interferiu na composição química da planta ou na sua atividade antibacteriana.

Palavras chave: *Calendula officinalis*, atividade antibacteriana, CLAE, CG-MS, toxicidade, mutagenicidade, sazonalidade.

ABSTRACT

The biological properties of the medicinal plants, traditionally used by the population, have been proved through intensive researches all over the world aiming at the validity of these plants as clinic agents in new phytopreparations. Recognizing the *Calendula officinalis* as one of main medicinal plants in use in Brazil and aiming at proving its pharmacological properties, which are informed in the traditional medicine, a chemical study biomonitoring by the antibacterial activity of this species was proceeded. For this reason, the study was held in several fractions obtained from its flowers (hexane, dichloromethane acetates of ethyl, methanol, ethanol 85%) The sensitivity profile was evaluated with respect to gram negative and gram positive pathogenic microorganisms (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*), using the cavity-plate and cylinder-plate methods. The results which were obtained revealed significant activity with respect to gram positive microorganisms, especially for the non polar fractions. From the bio active sub-fractions, β -Sistotol and Stigmasterol were isolated and identified, in addition to the triterpenes α -Amirin, Lupeol, a mixture of β and α -Amirin and the Faradiol Palmitic ester, all previously identified in *Calendula officinalis*. The isolated compounds had their antimicrobial evaluated under the same conditions previously described, displaying an MIC for the Lupeol of $\geq 750 \mu\text{g/mL}$ for *B. cereus*, $\geq 500 \mu\text{g/mL}$ for *M. luteus*, $\geq 500 \mu\text{g/mL}$ for *B.cereus* and for *S.aureus* for β -Sitosterol the MIC was $\geq 250 \mu\text{g-mL}$, for *M.luteus*. For the remaining compounds the MIC was greater than $1000 \mu\text{g/mL}$ for all microorganisms tested. When the crude extract and active fraction were tested with respect to 32 multiresistent *Staphylococcus aureus* strains, isolated in Municipal Health Centers and identified biochemically, the antibacterial activity was less significant compared to that obtained for the standard strain. In this study, it was possible to observe that the degree of sensitivity of the microorganisms to the extracts tested is equivalent to the Penicillin and Ampicillin antimicrobial standards. Although the active polar fraction was found to be slightly more effective than the crude extract in the inhibition of microorganisms, statistical studies showed such differences to be insignificant as for its use. The processes traditionally used for the extraction of the

medicinal plants such as: percolation, sonication and vortex shaking, were assessed in quantitative way through GG-MS. The results showed that there were not significant differences in the concentration of Stigmasterol and β -Sitosterol steroids in the evaluated extraction processes and in the anti- microbiological potential of the tested extracts as well. Although the plant extract which has been administered to rats orally has not presented toxicity rates, the evaluation of toxicological potential through intra-peritoneal via made it possible to visualize the harmful effect of the crude extract of the *Calendula officinalis* flowers produced in guinea pigs. The study of the acute mutagenic potential held by the micronucleus test, orally and intra-peritoneal via and the orally sub-acute study as well, has not shown signals of mutagenicity. However, the study of the sub-acute mutagenic activity through intra-peritoneal via, has revealed signals of mutagenicity for guinea pigs. The Ames test has not revealed mutagenicity. The seasonal control achieved throughout the twelve months of the year for the total solid content, chromatographic profile in CLAE and the antibacterial activity, reached the literature data which refer to the *Calendula* as a plant which may be picked all over the year. When these data are confronted with those which were obtained for the *Calendula* of Egyptian origin we realize that the plant adaptation in Brazil has not interfered in the plant chemical composition or in its antibacterial activity.

Key words: *Calendula officinalis*, antibacterial activity, CLAE, CG-MS, toxicity, mutagenicity, seasonality.

1. INTRODUÇÃO

Desde o princípio das civilizações, os vegetais têm sido utilizados não só como fonte alimentícia, como também medicamentosa. As mais diversas enfermidades têm sido tratadas com chás (infuso, decocto, macerados), sucos, tinturas, banhos, cataplasmas e ungüentos, preparados a partir das plantas (ALMEIDA, 1993). A referida conduta terapêutica remonta, principalmente, aos antigos povos da China, Egito, Ásia, Roma, em que os eruditos, com base em seus conhecimentos, classificaram numerosas espécies vegetais, com a respectiva indicação do uso medicinal. Posteriormente, os gregos instituíram o emprego racional das plantas na prática médica, sendo seguido pelos clínicos da Europa Ocidental.

A idéia primordial na indicação do uso de fitoterápicos na medicina humana não é substituir medicamentos registrados e já comercializados, mas sim aumentar a opção terapêutica dos profissionais de saúde, ofertando medicamentos equivalentes, também registrados, por vezes mais baratos, com espectro de ação mais adequado, com indicação terapêutica ou complementar às medicações existentes. Outro fator importante seria a valorização das tradições populares e o fornecimento de substrato para a indústria farmacêutica local.

O emprego de plantas medicinais para a prevenção, tratamento ou cura de doenças é umas das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. A Organização Mundial da Saúde (OMS) divulgou, no início da década de 1990, que entre 65 a 80 % da população, nos países em desenvolvimento, dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde.

Até a década de 50, os medicamentos utilizados eram quase exclusivamente de origem vegetal. A partir daí foram paulatinamente sendo substituídos por medicamentos contendo substâncias ativas deles extraídos ou seus derivados sintéticos. Em consequência desta prática, poucas plantas medicinais foram estudadas, sendo que a maioria das informações atualmente disponíveis não atende ao mínimo exigido para garantir a eficácia e segurança deste tipo de terapia (SIMÕES *et al.*, 1999).

Ao longo do tempo têm sido registrados vários procedimentos clínicos tradicionais utilizando plantas medicinais. As plantas são comercializadas apoiadas em propagandas que prometem benefícios seguros, já que se trata de fonte natural. Muitas vezes, entretanto, as supostas propriedades farmacológicas anunciadas não

possuem validade científica, por não terem sido investigadas, ou por não tido suas ações farmacológicas comprovadas em testes pré-clínicos.

Atualmente não só no Brasil, mas também em diversos países, um grande número de vegetais vem sendo utilizado como fonte alternativa de extração de fármacos para indústria farmacêutica. Cerca de 60% dos fármacos lançados no mercado norte-americano entre 1985 e 1995 são de origem natural (SIMÕES *et al.*, 1999). Estimativas revelam que o mercado mundial de produtos farmacêuticos movimenta cerca de US\$ 320 bilhões/ano, dos quais US\$22 bilhões oriundos de fontes naturais. No Brasil estima-se que 25% dos US\$8 bilhões do faturamento da indústria farmacêutica sejam derivados de plantas (SIMÕES *et al.*, 1999). Considerando que o Brasil possui a flora mais rica do mundo em matéria prima para a produção de fitofármacos (cerca de 1/3 do total) e que apenas 8% já foram estudadas, é de suma importância que se busque nestas plantas uma fonte alternativa de terapia, visando no futuro à obtenção de novos fármacos mais eficazes e específicos (BRAZ-FILHO, 1994). O sucesso da pesquisa para validação destas plantas visando a obtenção de novos agentes clínicos vai depender da multidisciplinaridade entre fitoquímicos, botânicos sistemáticos, farmacologistas e microbiologistas.

Ao se abordar o tema “plantas medicinais” deve-se ter bem claro certos conceitos. A planta medicinal, definida pela OMS (Organização Mundial da Saúde), é “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos” (BULETIN OF THE WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998). A diferença entre planta medicinal e fitoterápico reside na elaboração da planta para uma formulação específica, o que caracteriza um fitoterápico. De acordo com a definição da Secretaria da Vigilância Sanitária, publicado pela portaria nº 6 de 31 de janeiro de 1995, fitoterápico é “todo medicamento tecnicamente obtido e elaborado, empregando-se exclusivamente matérias-primas vegetais com finalidade profilática, curativa ou para fins de diagnóstico, com benefício para o usuário. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos do seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. É o produto final acabado, embalado e rotulado. Na sua preparação podem ser utilizados adjuvantes farmacêuticos permitidos na legislação vigente, não podem estar incluídas substâncias ativas de outras origens, ainda que de origem vegetal, isoladas ou

mesmo em misturas”. Já o medicamento é um produto preparado seguindo procedimentos legais e que tenha sido caracterizado em termos de sua eficácia, segurança e qualidade (CALIXTO, 2000). Com relação aos fitoterápicos, é comum encontrarmos a presença de “substâncias não identificadas”, adulterantes, diluentes e ainda a mistura com outros extratos vegetais. Neste último caso, existe a possibilidade do comprometimento da qualidade do fitoterápico, um assunto que vem sendo abordado recentemente em publicações científicas (VEIGA *et al.*, 2002; VEIGA *et al.*, 2001).

Um composto vegetal caracterizado é aquele que possui um constituinte fito químico, proveniente de uma parte da planta, que pode ser usado para garantir a identidade ou a qualidade da preparação fitoterápica, não sendo necessariamente responsável pelos efeitos terapêuticos ou biológicos da planta.

O isolamento de substâncias ativas naturais que possuem atividade biológica tem inúmeras vantagens, pois o composto bioativo pode ser administrado e/ou quantificado de forma reprodutível e em doses exatas, constituindo um benefício do ponto de vista experimental e terapêutico (COLEGATE; MOLYNEUS, 1993).

A globalização do uso de plantas medicinais leva à necessidade de se desenvolver métodos para otimização e padronização, com finalidade de se obter um material apropriado para o consumo, buscando investigar qualidade, segurança e eficiência do uso de produtos naturais, sua pureza, identidade e estabilidade.

A regulamentação para o controle de qualidade de produtos derivados de plantas medicinais varia de país para país. Nos EUA as mesmas são consideradas como suplemento alimentar. Já em outros países como Alemanha, França, Inglaterra e outros são obrigatórios a utilização de métodos seguros e padronizados de qualidade de manufaturados vegetais (SARDESAI, 2002). No Brasil a legislação que trata do assunto foi revisada e publicada na RDC 48 (Resolução da Diretoria Colegiada), de 16/03/04, onde determina a apresentação da metodologia detalhada utilizada no controle de qualidade, com métodos analíticos devidamente validados para o medicamento fitoterápico. A mesma resolução define para controle de qualidade da droga vegetal no produto acabado, como “resultado da prospeção” (*screening*) fitoquímico, ou perfil cromatográfico, por CLAE ou CG.

Devido à falta de informações precisas, nem os próprios órgãos reguladores das boas práticas de fabricação definem claramente quais técnicas cromatográficas

e métodos devem ser utilizados para a fabricação de medicamentos oriundos para a maioria das plantas com potencial farmacológico, com o objetivo de se realizar um controle de qualidade adequado. Neste sentido, pesquisas realizadas demonstram que os equipamentos necessários para um correto controle de qualidade envolvem instrumentação analítica como CLAE e CG além de dados espectroscópicos dos constituintes presentes no extrato ou material vegetal (BAUER; TITTEL, 1996). Como a terapêutica de um material vegetal geralmente está relacionada não a um simples composto, mas a várias classes de metabólitos secundários, a análise química deve ser caracterizada da forma mais completa possível (CAPASSO *et al.*, 2000).

Quando os constituintes químicos de uma preparação vegetal são conhecidos, a caracterização se faz sobre estes compostos e a cromatografia qualitativa é complementada com a determinação quantitativa das substâncias ativas por meio de CLAE ou CG analítica, obtendo-se assim uma correlação entre a quantidade dos compostos presentes e sua eficácia terapêutica e farmacológica. Em preparações que não se conhece a totalidade dos constituintes químicos, compostos dominantes ou marcadores químicos podem ser utilizados para a sua caracterização, mesmo não estando relacionados com a atividade do extrato.

A Farmacopéia Brasileira, literatura oficial utilizada na consulta de dados analíticos para medicamentos, incluiu em sua 4ª edição com o fascículo 2 revisado, a *C. officinalis*. Sua recomendação para controle de qualidade se resume a caracterização farmacognóstica clássica e a determinação qualitativa do teor de flavonóides totais bem como a presença, por meio de CCD, do flavonóide rutina e do ácido clorogênico. Quando se analisa as informações disponíveis em literaturas oficiais destinadas ao estabelecimento de parâmetros de qualidade relacionados à *C. officinalis*, observa-se que não existem dados precisos sobre o processo de extração adequado à planta e se este pode influenciar de alguma forma no seu efeito terapêutico. Quanto ao processo de floração, torna-se evidente que o mesmo ocorre durante todo o ano, porém faltam informações sobre a constância de sua composição química. Estão disponíveis diversos trabalhos relacionados à sua atividade antimicrobiana, porém quando se trata de informações sobre a quantificação do(s) composto(s) ou classe de compostos responsáveis pela atividade relatada, passíveis de serem aplicados na rotina analítica dos laboratórios de produção de fitopreparados, os dados são pouco precisos. Apesar do emprego

da tintura ou outras formas extrativas da planta ser recomendado para utilização externa e interna, existem poucos dados sobre a segurança relacionados a toxicologia e mutagenicidade decorrente de sua utilização a curto e longo prazo.

Em decorrência da importância deste material vegetal no contexto nacional e especialmente em virtude da contribuição das produções vegetais paranaense, aliadas à ausência de elementos cognitivos sobre a droga produzida localmente, se oportunizam estudos químico e biológico deste cultivar aculturados na região dos Campos Gerais, que garantam sua eficácia e segurança. A transparência da constituição química do vegetal permite a seleção de marcadores químicos na prospecção e monitoramento de estudos de elaboração, otimização e validação da metodologia analítica, bem como de elementos que apoiem as operações extrativas e o desenvolvimento de processos de extração.

1.1. LEGISLAÇÃO BRASILEIRA SOBRE FITOTERÁPICOS:

A legislação RDC 48, de 16 de março de 2004, atualmente em vigor, visa a normatização do registro de medicamentos fitoterápicos. Esta resolução determina que todos os testes referentes ao controle de qualidade de fitoterápicos deverão ser realizados em rede credenciada no sistema REBLAS (Rede Brasileira de Laboratórios em Saúde) ou por empresas registradas antes de 31 de janeiro de 1995. Com exceção dos produtos já enquadrados como fitoterápicos tradicionais, deverá apresentar num primeiro protocolo de renovação uma série de relatórios que atestem a segurança, eficácia e as normas de produção e controle de qualidade.

Dentre as divergências desta RDC estão a necessidade do controle de qualidade do produto acabado, com métodos analíticos que incluam perfis cromatográficos e resultados de prospecção fitoquímica, além de comprovação de segurança de uso, incluindo estudos de toxicidade pré-clínica. Outras resoluções da mesma data fornecem as referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia de fitoterápicos, tratando ainda de detalhes dos estudos de toxicidade e fornecendo os requisitos necessários para o processo de registro, além da lista de registro simplificado.

1.2 INVESTIGAÇÃO BIOMONITORADA DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE PLANTAS MEDICINAIS

As propriedades antimicrobianas têm sido comprovadas através de intensivas pesquisas em todo o mundo. Geralmente, são estudadas, avaliadas e confirmadas por meio de ensaios biológicos *in vitro* (susceptibilidade e sensibilidade). Estes ensaios são realizados por meio de técnicas padronizadas, incluindo os métodos de diluição e/ou difusão em meio sólido – disco, cavidade, clindro (ESPINEL-INGROFF; PFALLER, 1995; WOODS; WASHINGTON, 1995). Portanto, a pesquisa de atividade antimicrobiana pode ser analisada com a finalidade de se determinar o espectro antibacteriano ou antifúngico de um novo antibiótico ou ainda na verificação da resistência ou sensibilidade de uma bactéria ou fungo a numerosos antibióticos.

1.3 MECANISMO DE AÇÃO DOS ANTIMICROBIANOS

Com base em testes *in vitro*, os agentes antimicrobianos são classificados em bactericidas ou bacteriostáticos. Os agentes bactericidas matam os microorganismos e são mais eficazes durante a fase de crescimento logarítmico, uma vez que o aumento da atividade metabólica proporciona susceptibilidade máxima. Os agentes antimicrobianos bacteriostáticos apenas previnem o crescimento bacteriano e são clinicamente menos desejáveis (THOMPSON; BEVAN, 1979).

De um modo geral, os agentes antimicrobianos podem manifestar sua atividade por meio de vários mecanismos: lesão da parede celular, alterações da permeabilidade celular, alterações das moléculas de proteínas e ácidos nucleicos, inibição da síntese de ácidos nucleicos (FONSECA, 1999; TAVARES, 1996). Contudo, numerosos estudos têm sido realizados com a finalidade de estabelecer o sítio específico da ação de um agente antimicrobiano. Esses estudos mostraram-se bastante complexos pelo fato das várias modificações que ocorrem nas células expostas a um agente antimicrobiano, tornando difícil o estabelecimento do local primário da lesão celular, onde vai ocorrer, como consequência, a deterioração das atividades vitais (PELCZAR *et al.*, 1980).

Os ensaios da atividade antimicrobiana são influenciados por um grande número de variáveis técnicas ou fatores que podem interferir significativamente na pesquisa de atividade de agente antimicrobiano, incluindo a preparação e o tamanho do inóculo, a formulação do meio e seu pH, duração e temperatura de incubação e o critério utilizado para a verificação do resultado do ensaio. Para se

obter êxito e uniformidade nos testes de atividade, esses fatores devem ser muito bem controlados (ESPINEL-INGROFF; PFALLER, 1995). No que diz respeito ao microorganismo em teste, a atividade antimicrobiana pode depender do tipo, gênero, espécies e cepas. O meio de cultivo e soluções diluentes deverá ser selecionado de modo que previnam a “injúria celular”. Células injuriadas requerem um meio nutritivo de recuperação (meio de enriquecimento) sem a presença de agentes inibidores ou de diferenciação. O meio de cultivo inadequado pode produzir resultados onde os microrganismos aparentemente apresentam alta susceptibilidade ao agente que se está pesquisando (BARRY, 1986). A uniformidade de preparação do agente antimicrobiano, pureza do solvente utilizado, solubilidade e sua estabilidade, também podem influenciar no ensaio. O tempo de exposição deverá ser cuidadosamente controlado. O número inicial de células utilizado durante o ensaio antimicrobiano deverá ser consistente para assegurar resultados reprodutíveis. O efeito da temperatura também é importante, seja durante a exposição ou durante a etapa de incubação. A temperatura de exposição deverá ser ótima para o microorganismo testado, para se recuperar o número máximo de células viáveis e prevenir a impressão do aumento de atividade do agente. Condições de anaerobiose ou microaerofilia deve ser considerada na composição da atmosfera. Níveis de pH também podem afetar a atividade de antimicrobianos (WOODS; WASHINGTON, 1995). Finalmente as propriedades básicas próprias do agente antimicrobiano como, sua solubilidade, estabilidade química, como de ação e a tendência de produzir inibição parcial de crescimento sob diferentes concentrações, devem ser levadas em consideração (ESPINEL-INGROFF; PFALLER, 1995).

1.3.1 SELEÇÃO DOS MICRORGANISMOS

Com relação aos microrganismos, geralmente são selecionados e utilizados nos ensaios microbiológicos, gêneros e espécies de bactérias e fungos ou outros microrganismos patogênicos, oportunistas e saprófitas. Podem ser cepas padrão como American Type Culture Collection – ATCC ou Central bureau voor Schimmelcultures – CBS, ou microrganismos isolados a partir de materiais biológicos. Nestes testes de atividade antimicrobiana sempre se incluem bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus*), gram negativas, que representam bactérias ácido resistentes (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella*

penumoniae; *Mycobacterium smegmatis*), além de fungos (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*) (CLEELAND; SQUIRES, 1991).

1.3.2 TÉCNICAS EMPREGADAS

Um *screening* inicial do potencial antibacteriano e antifúngico para compostos fitoquímicos podem ser realizados para extratos brutos ou semi-purificados (FREIBURGHHAUS *et al.*, 1996; SILVA *et al.*, 1996; ROJAS *et al.*, 1992) ou compostos puros (AFOLAYAN *et al.*, 1997; BATISTA *et al.*, 1994; KLOPUKH *et al.*, 1997). Os ensaios de atividade antimicrobiana referem-se às diferentes técnicas ou métodos laboratoriais *in vitro* utilizados para determinar o potencial antimicrobiano de um determinado agente.

No método de difusão a substância em pesquisa é colocada num reservatório (disco de papel, cavidade no meio de cultura ou cilindro sobre a superfície), em contato com um meio de cultura sólido, inoculado com um determinado microorganismo. Após o tempo adequado de incubação, mede-se o diâmetro ou halo de inibição – zona clara onde não houve crescimento microbiano – ao redor da substância em pesquisa (disco, cavidade ou cilindro) (ESPINEL-INGROFF; PFALLER, 1995; BARRY, 1986). Neste método a informação obtida é qualitativa, útil para estabelecer a sensibilidade do microorganismo. O método apresenta problemas com as substâncias que não se difundem no meio (ZACCHINO, 2001).

A técnica da diluição, que emprega a amostra a ser testada dissolvida num meio sólido ou líquido conveniente, possui a vantagem de ser quantitativo. A desvantagem deste método reside no fato do excessivo trabalho envolvido na realização, no consumo considerável de material e de estar sujeito à solubilidade no sistema aquoso (FREIBURGHHAUS *et al.*, 1996).

O método bioautográfico é útil para a localização de compostos com ação antimicrobiana em um cromatograma de um extrato ou fração complexa de produtos naturais. Isto permite o isolamento “biodirecionado” de compostos ativos. Na técnica bioautográfica, denominada bioautografia por imersão, um meio de cultura sólido fundido inoculado é aplicado sobre a placa cromatográfica, na qual foi eluído o extrato ou fração. Durante a incubação da placa, os compostos deverão ultrapassar o meio por difusão formando zonas de inibição do crescimento microbiano (RAHALISON *et al.*, 1994).

1.3.3 PLANTAS MEDICINAIS COM POTENCIAL ANTIMICROBIANO

Em decorrência dos problemas devido ao uso abusivo de prescrições médicas de antibióticos tradicionais, os microbiologistas clínicos têm demonstrado grande interesse na investigação de extratos de plantas, com potencial antimicrobiano.

Diferentemente do que ocorre com os agentes antibióticos e quimioterápicos, há poucos registros na literatura quanto ao possível mecanismo de ação de produtos oriundos de plantas. Os compostos isolados de plantas são substâncias com estruturas químicas bem diferenciadas dos antimicrobianos obtidos a partir de bactérias, leveduras e de fungos. Tais produtos podem atuar no metabolismo intermediário ativando enzimas, alterando a ação de inibidores que influenciam os nutrientes do meio, inferindo nos processos enzimáticos em nível nuclear ou ribossomal, provocando alterações nas membranas ou ainda interferindo no metabolismo secundário (COWAM, 1999).

De um modo geral, as plantas têm uma habilidade ilimitada para sintetizar compostos aromáticos, sendo na sua maioria compostos fenólicos e seus derivados (GEISSMAN, 1963). Em muitos casos estas substâncias servem como mecanismo de defesa da planta contra predadores, como microrganismos, insetos e herbívoros. Alguns compostos, como os terpenoides, conferem à planta seu odor, outros (quinonas e taninos) são responsáveis pelo pigmento. Muitos compostos são responsáveis pelo sabor da planta, sendo algumas espécies utilizadas na culinária como tempero de alimentos. Segundo COWAN (1999), os compostos com atividade antimicrobiana podem ser divididos em várias categorias, resumidos na tabela 1. Alguns exemplos de compostos químicos com atividade antimicrobiana estão representados na figura 1.

Com o advento e desenvolvimento da ecologia bioquímica, foi atribuída às referidas substâncias, importância relevante nos mecanismos de defesa das plantas contra seus predadores, como fungos, bactérias, vírus, parasitas, insetos, moluscos e animais superiores (HAENEN, 1985). Assim, quando determinadas espécies vegetais são agredidas por bactérias, fungos, parasitas, vírus ou outros agentes agressores, rapidamente sintetizam substâncias de defesa, como resultado da interação entre os sistemas metabólicos do hospedeiro e do parasita.

TABELA 1: CLASSES DE COMPOSTOS ORIGINADOS DE PLANTAS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

| NOME CIENTÍFICO | COMPOSTO | CLASSE | ATIVIDADE ^A | TOXICIDADE RELATIVA ^B | REFERÊNCIA |
|------------------------------|---|--|--|----------------------------------|--|
| <i>Thymus vulgaris</i> | Ac. Cafeico, Timol Tanino | Álcool fenólico Polifenol | Vírus, bactéria e fungos | 2.5 | THOMSON, 1978 |
| <i>Podocarpus nagi</i> | Totarol Nagilactone | Flavonol Lactona | <i>P. acnes</i> , bact. Gram + Fungos | 0 | KUBO, 1994 KUBO, 1992 KUBO, 1993 |
| <i>Curcuma longa</i> | Curcumina Óleo tumerico | Terpenoides | Bactéria, protozoário | 0 | APISARIYAKUL <i>et al.</i> , 1995 |
| <i>Valeriana officinalis</i> | Óleo essencial | Terpenoides | vários | 2.7 | THOMSON, 1978 |
| <i>Salix alba</i> | Salicilina Tanino Óleo essencial | Fenólico glicosilado Polifenol Terpenoide | vários | 0 | THOMSON, 1978 |
| <i>Gautheria procumbens</i> | Taninos | polifenol | vários | 1.0 | HAMBURGUER, 1991 |
| <i>Galium odoratum</i> | | Cumarinas | Vários | 3.0 | BOSE, 1958; HAMBURGUER, 1991; SCHEEL, 1972 |
| | | | Vírus | 0 | BERKADA, 1978 |
| <i>Achillea millefolium</i> | | | Viroses, helmintíca | 2.3 | THOMSON, 1978 |
| <i>Rumex crispus</i> | | | <i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Staphylococcus</i> | 1.0 | THOMSON, 1978 |

^A 0, sem toxicidade; 3, muito tóxico^B Vários denota atividade contra múltiplos tipos de microrganismos (bactéria, fungos, protozoários), e "bactéria" denota atividade contra bactérias gram positivo e gram negativo

COMPOSTOS FENÓLICOS E POLIFENÓLICOS

O mecanismo de ação parece ser a toxicidade dos fenólicos ao microorganismo, incluindo a inibição de enzimas por compostos oxigenados, possível reação com grupos sulfidril e outras reações não específicas com proteínas (MASON; WASSERMAN, 1987). O ácido cinâmico e cafeico são bons representantes de compostos fenólicos com alto grau de substituição. O ácido cafeico é muito efetivo contra viroses (WILD, 1994), bactérias (BRANTNER *et al.*, 1996; THOMSON, 1978) e fungos (DUKE, 1985). O catecol (2x OH) e pirogalol (3x OH) se mostraram tóxicos para microrganismos. O local (sítio) e o número de grupos

hidroxil e grupo fenólico são associados ao efeito tóxico aos microrganismos, sendo que o aumento da hidroxilação resulta no aumento da toxicidade (GEISSMAN, 1963). Em adição, alguns autores têm relatado que quanto maior a oxidação dos fenóis, maior a inibição do desenvolvimento de microrganismos (SCALBET, 1991; URS; DUNLEAVY, 1975).

QUINONAS

Quinonas são compostos aromáticos com 2 cetonas substituintes. As quinonas são conhecidas por formar complexos irreversíveis com ácidos amino-nucleofílicos em proteínas (STERN *et al.*, 1996), frequentemente levando à inativação da proteína e perda da função. Por esta razão, o potencial antimicrobiano das quinonas é grande. As quinonas também podem inutilizar o substrato para os microrganismos.

FLAVONAS, FLAVONÓIDES E FLAVONOLS

Flavonas são estruturas fenólicas contendo um grupo carbonila. A adição de um grupo 3 hidroxila temos o flavonol (FESSENDEN; FESSENDEN, 1982). São conhecidos por serem sintetizados por plantas com infecção microbiana (DIXON *et al.*, 1983) e apresentam *in vitro* o mesmo efeito antimicrobiano. Provavelmente sua atividade se dá pela habilidade de se complexar com proteínas e com células bacterianas, como descrito para as quinonas. Muitos flavonóides lipofílicos podem ainda romper a parede bacteriana (TSUCHIYA *et al.*, 1996).

TANINOS

De um modo geral o nome tanino é dado ao grupo de substâncias fenólicas poliméricas capaz de curtir a pele de animais, propriedade conhecida como adstringência. Seu modo de ação antimicrobiano, como descrito para as quinonas, pode ser traduzido pela sua habilidade de inativar enzimas microbianas e células de transporte de proteínas. Também formam complexos com polissacarídeos (YA *et al.*, 1988). A significância desta atividade particular não foi bem esclarecida, havendo ainda evidências para a inativação de microrganismos. Taninos em plantas inibiram o crescimento de insetos (SCHULTZ, 1988). Em outro estudo resultou em ruptura digestiva em animais ruminantes (BUTLER, 1988).

CUMARINAS

Cumarinas são substâncias resultantes da fusão do benzeno e α -pirona (O'KENNEDY; THORNES, 1997). São responsáveis pelo odor do feno. Seu uso é famoso pelas propriedades antiinflamatórias (PITLER *et al.*, 1975), antitrombótica (THASTRUP *et al.*, 1985) e vasodilatadora (NAMBA *et al.*, 1988). As cumarinas são conhecidas pela alta toxicidade em roedores (US DETARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 1992). Várias cumarinas apresentam propriedades antimicrobianas, sendo encontrado *in vitro* inibição para *Candida albicans* (THORNES, 1997).

TERPENÓIDES E ÓLEO ESSENCIAL

Terpenos ou terpenoides são ativos contra bactérias (AHMED *et al.*, 1993; AMARAL *et al.*, 1998; BARRE *et al.*, 1997; HIMEJIMA *et al.*, 1992; KUBO *et al.*, 1992; MENDOZA *et al.*, 1997; TASSOU *et al.*, 1995), fungos (AYAFOR *et al.*, 1994; KUBO *et al.*, 1993; RAO *et al.*, 1993), vírus (FUJIOKA; KASHIWADA, 1994; HASEGAWA *et al.*, 1994; WEINER *et al.*, 1980) e protozoários (GHOSHAL *et al.*, 1996). Em 1977 foi reportado que 60% dos óleos essenciais inibiam fungos enquanto que somente 30% deles inibiam bactérias (CHAURASIA; VYAS, 1977). O triterpenóide ácido betulínico é um dos vários triterpenos que mostrou inibição para HIV. O mecanismo de ação de terpenos não está completamente elucidado, mas supõe-se que envolve ruptura de membrana dos compostos lipofílicos. De acordo com MENDONZA *et al.* (1997) foi mostrado que aumentando a hidrofobicidade do diterpeno ácido caurenóico, por adição de um grupo metila, sua atividade antimicrobiana é reduzida drasticamente.

ALCALÓIDES

Compostos contendo átomos de nitrogênio heterocíclicos são chamados alcaloides. O primeiro medicamento contendo alcalóides como matéria prima foi a morfina, isolada em 1805 do opium papoula *Papaver soniferum* (FESSENDEN; FESSENDEN, 1982). O nome morfina vem do grego Morpheus, rei dos sonhos. Codeína e heroína são ambos derivados de morfina. Os alcaloides diterpênicos, comumente isolados de plantas das Ranunculaceae (JONES; LUCHSINGER, 1986; ATTA-UR-RAHMAN; CHOUDHARY, 1995) são comumente associados à atividade antimicrobiana (OMULOKOLI *et al.*, 1997). Solamargine, um glicoalcaloide dos frutos

(bagas) de *Solanum khasianum*, e outro alcaloide podem ser usados contra infecção HIV (SETHI, 1979), bem como em infecções intestinais associadas a AIDS (McDEVITT *et al.*, 1996).

LECTINA E POLIPEPTÍDEO

O primeiro relato de peptído com atividade antimicrobiana foi relatado em 1942 (BALLS, 1942), seu mecanismo de ação pode ser pela formação de canais de íon na membrana microbiana (TERRAS *et al.*, 1993; ZHANG; LEWIS, 1997) ou por inibição competitiva de adesão das proteínas microbianas dos polissacarídeos (SHARON; OFEK, 1986). Recentemente as atenções têm se voltado para as propriedades anti-HIV dos peptídeos e lectinas, porém suas propriedades antimicrobianas, como por exemplo, do *Amaranthus*, já são conhecidas de longa data (DE BOLLE *et al.*, 1996).

Tioninas e peptideos comumente encontrados em cevada e trigo constituída de 47 resíduos de amino-acidos (COLILLA *et al.*, 1990; MENDEZ *et al.*, 1990). Essas substâncias são tóxicas para leveduras e bactérias gram positivas e gram negativas (KRAGH *et al.*, 1995).

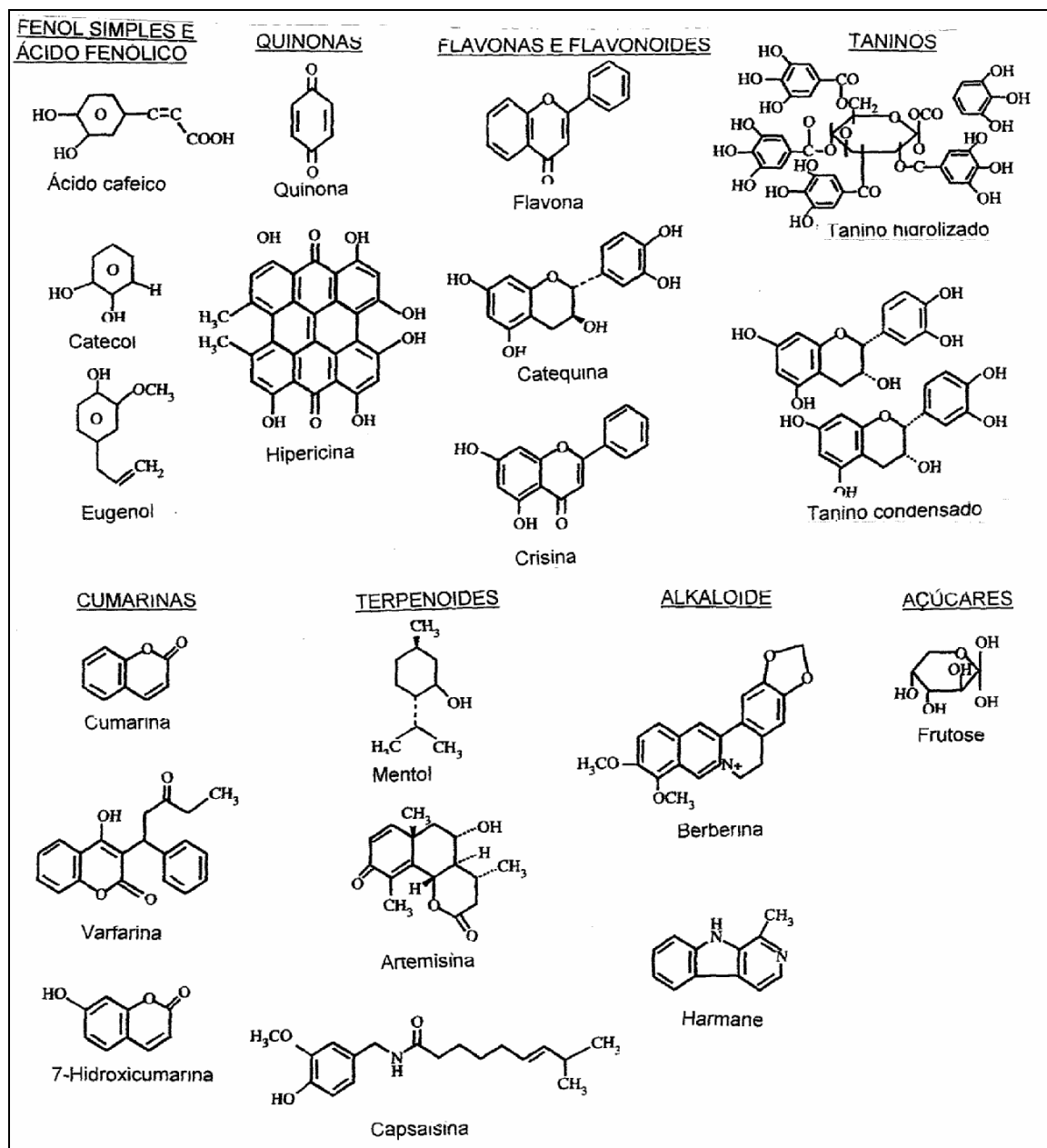


FIGURA 1: EXEMPLOS DE ESTRUTURAS QUÍMICAS DE COMPOSTOS ORIUNDOS DE PLANTAS MEDICINAIS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA (COWAN, 1999).

1.4 TOXICOLOGIA DE PLANTAS MEDICINAIS

O intenso apelo comercial advindo do forte movimento cultural dos naturalistas aqueceu, em todo o mundo, o consumo de plantas medicinais, onde não há limites de uso dos fitoterápicos. Entretanto, não se fornecem informações sobre os efeitos colaterais e o consumo de plantas, do modo como vem sendo feito, representa cada vez mais um risco para a saúde humana. Estudos multidisciplinares, associando fitoquímicos e farmacólogos, tornam-se cada vez mais

importantes para a definição dos potenciais terapêuticos e tóxicos de extratos vegetais.

A partir da definição de fitoterápico como “medicamento de origem vegetal”, o estudo toxicológico pré-clínico não difere em nada daquele recomendado para os produtos sintéticos ou semi-sintéticos. Assim, do mesmo modo que os medicamentos, além de provas de eficácia, um fitoterápico tem que possuir estudos toxicológicos pré-clínicos que indiquem qual a dosagem segura a ser utilizada.

Diversas substâncias isoladas de vegetais considerados medicinais possuem atividades citotóxica ou genotóxica e mostram relação com a incidência de tumores (AMES, 1981). Como exemplo de toxicidade relacionada a substâncias presentes em plantas, pode ser citado o efeito tóxico renal causado por espécies vegetais que contêm terpenos e saponinas, bem como alguns tipos de dermatites, causadas por espécies ricas em lactonas sesquiterpênicas e produtos naturais do tipo furanocumariáns (CAPASSO *et al.*, 2000). Substâncias consideradas hepatotóxicas foram associadas ao apiol, safrol, lignanas e alcalóides pirrolizidínicos (CAPASSO *et al.*, 2000).

O confrei (*Symphytum officinale* L.), considerado um produto natural com potente efeito cicatrizante da pele devido à presença de alantoína, foi condenado pela OMS por provocar uma doença hepática veno-oclusiva, desencadeada pelos alcalóides pirrolizidínicos, que além da hepatotoxicidade provoca ainda carcinogênese (BUCKEL, 1998).

Apesar de estudos anteriores apontarem uma baixa toxicidade pelo uso da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*) (OLIVEIRA *et al.*, 1991), estudos recentes realizados em ratas grávidas, apontaram efeito colateral abortivo decorrente do seu uso bem como ação anti-ulcerogênica (SOUZA-FORMIGONI *et al.*, 1991), anti-inflamatória e antinociceptiva (JORGE *et al.*, 2004). Os extratos hidroalcoólicos desta planta mostraram-se abortivos por atuarem no período de pré-implantação dos embriões no útero.

Alguns óleos essenciais também devem ser usados com cautela, como exemplo, os provenientes de bétula (*Betula alba*), cedro (*Cedrela brasiliensis*), erva-doce (*Pimpinella anisum*), jasmim (*Jasminum officinalis*), manjerição (*Origanum basilicum*), manjerona (*Manjerona hortensis*) e lavanda (*Lavanda angustifolia*) (DAVIS, 1996).

No caso de gestantes o uso de espécies vegetais deve seguir rigorosamente os mesmos cuidados dos medicamentos alopáticos. Entre as plantas medicinais que podem causar riscos para mulheres grávidas, por estimular a motilidade uterina e provocar aborto, encontram-se o alho (*Allium sativum*), aloe (*Aloe ferox*), angélica (*Angelica archangelica*), arnica (*Arnica montana*), cânfora (*Cinnamomum canphora*) e sene (*Cassia angustifolia*). Também há risco para lactentes, associados ao consumo de plantas medicinais pela mãe durante o aleitamento (DAVIS, 1996).

Como opção para a investigação da presença de possíveis agentes tóxicos nos extratos vegetais, o método da toxicidade aguda em dose simples representa uma avaliação estimativa e preliminar das propriedades tóxicas de um fitoterápico, fornecendo informações iniciais acerca dos riscos sobre a saúde, resultante de uma exposição de curta duração pela via de administração selecionada. Já a toxicidade aguda em doses repetidas (ou cumulativa) fornece as mesmas informações decorrentes de uma exposição em doses repetidas. Após a administração da substância teste, pela via escolhida, é feita uma observação clínica dos sintomas produzidos pela administração do fitoterápico nos animais. A anotação das respostas é efetuada em 30 minutos, 1, 2, 4, 12 e 24 horas após a administração e a partir deste tempo, uma vez ao dia durante o período de observação de 14 dias, sendo as mais importantes: alteração de pêlo, pele e mucosas; sistemas respiratório e circulatório; sistemas nervoso central e periférico; atividade somatomotriz e comportamento. Especial atenção é dada aos sintomas, tais como: tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia e coma. Os resultados do estudo podem demonstrar a necessidade de estudos de média e longa duração (BRITO, 1994).

1.5 AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS MUTAGÊNICOS

Os testes regulatórios de genética toxicológica se constituem em uma série de testes de mutagenicidade, bem definidos, selecionados para detectar agentes químicos e físicos capazes de induzir mutações. Uma mutação é definida como “toda alteração do material genético de uma célula que não resulta de segregação ou recombinação”. Quando não é letal para a própria célula, ela pode propagar-se pelo corpo em crescimento (mutação somática) ou transmitir-se às gerações seguintes (mutação germinal). Uma vez que as mutações são freqüentemente

associadas com o desenvolvimento de câncer e defeitos ao nascimento, o conhecimento do potencial genotóxico de um agente químico industrializado ou naturalmente presente no ambiente é uma informação essencial para as agências regulatórias, no que se refere ao estabelecimento de risco para o homem. Os bioensaios avaliam o dano causado ou ao DNA ou ao material genético em teste na presença de sistemas metabólicos de ativação e têm por objetivo avaliar o risco potencial que os compostos químicos ou misturas complexas representam para a saúde humana, devido à sua interação com mecanismos genéticos e alterações hereditárias (mutações) que poderão causar (BRUSICK; YOUNG, 1981).

Uma variedade de compostos que existe na natureza pode exercer atividade antimutagênica. AMES (1981), reportou que algumas substâncias de origem natural possuem fatores que poderiam reduzir ou inibir a atividade de mutagênese da dieta humana.

1.5.1 Investigação da mutagênese pelo teste de micronúcleos

O teste de micronúcleo é o ensaio “*in vivo*” mais amplamente utilizado para a detecção de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos), e de agentes aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal) (MACGREGOR *et al.*, 1987). O procedimento foi desenvolvido por HEDLE (1973) e modificado por SCHMID (1975). As características básicas do teste são:

- (a) o efeito do agente químico é observado em eritrócitos policromáticos anucleados (PCEs);
- (b) o eritrócito policromático tem um tempo de vida relativamente curto, de modo que qualquer micronúcleo que ele contenha deve ter sido gerado como resultado de danos cromossômicos induzidos recentemente;
- (c) os micronúcleos são facilmente identificáveis e sua distribuição é bem definida;
- (d) a frequência de micronúcleo induzida em eritrócito policromático é dependente do tempo de amostragem.

Os micronúcleos (MN) aparecem nas células filhas, em decorrência de danos induzidos nas células parenterais. Os fragmentos cromossômicos que resultam de quebras, podem não ser incorporados no núcleo principal das células filhas após a mitose. Os MN podem, também, ser formados a partir de um cromossomo inteiro, quando ocorre dano no aparelho mitótico da célula, ou no próprio cromossomo.

Nesta situação, o MN irá conter o centrômero do cromossomo, o qual pode ser detectado utilizando-se sondas específicas.

1.5.2 Investigação da mutagênese pelo teste de Ames

Este ensaio foi desenvolvido por Bruce Ames na década de 70 (AMES, 1971) e tem por objetivo avaliar a capacidade de determinados compostos químicos ou misturas complexas, induzirem mutações no genoma de linhagens de *Salmonella typhimurium* através da reversão do fenótipo histidina negativo (his^-) para histidina positivo (his^+), na presença ou ausência de sistemas metabólicos de ativação. Vários autores têm demonstrado que existe alta correlação entre a atividade mutagênica em *S. typhimurium* e efeitos cancerígenos em mamíferos (MESELSON; RUSSEL, 1977).

1.6 COMPOSTOS DA CLASSE DOS TRITERPENOS

Os triterpenos são amplamente distribuídos entre o reino vegetal, especialmente nas plantas clorofiladas. Os terpenos são classificados em múltiplos de unidades isopreno como hemiterpenos (C_5H_8); monoterpenos ($C_{10}H_{16}$); sesquiterpenos ($C_{15}H_{24}$); diterpenos ($C_{20}H_{32}$); sesterpenos ($C_{25}H_{40}$); triterpenos ($C_{30}H_{48}$) aos quais os esteróides estão intimamente relacionados; tetraterpenos ($C_{40}H_{64}$) e politerpenos (C_5H_8) (OLEA; ROQUE, 1990).

Segundo HARBONE e BAXTER (1983), os triterpenoides podem ser divididos em quatro classes:

- Triterpenoides verdadeiros;
- Esteróides são triterpenos baseados na estrutura do ciclopentanoperidrofenantreno. Ocorrem livres ou como glicosídeos.
- Saponinas são glicosídeos de esteróides ou triterpenos que têm ação surfactante e propriedades afrogênicas e de hemólise.
- São também triterpenos os cardenólidos ou glicosídeos cardioativos.

A literatura indica para os triterpenos uma diversidade muito ampla quanto a esqueleto carbônico e funcionalização. Os grupos funcionais, predominantemente oxigenados, podem ser de qualquer espécie e é comum a ocorrência de triterpenos com mais de um grupo funcional oxigenado (OLEA; ROQUE, 1990).

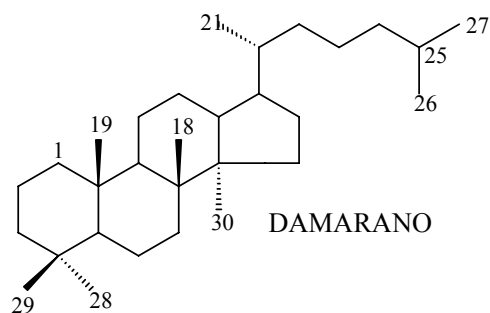
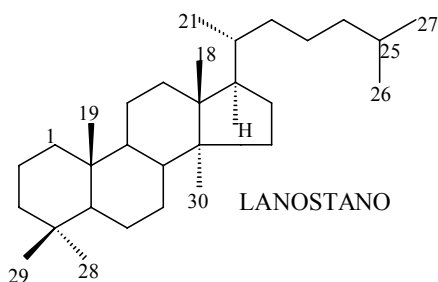
Os triterpenos consistem na sua grande maioria de compostos de estrutura policíclica sendo tetracíclicos ou pentacíclicos. Alguns deles são substâncias

alifáticas totalmente saturadas e muitos têm caráter olefínico, possuindo uma, duas e até três ligações duplas, acompanhadas na maioria dos casos de grupos funcionais oxigenados como -OH, -OR, -OAc, -COOH, -COOR, =O. Existem dois extensos grupos tetracíclicos: lanostano e damarano (figura 2).

A função que este tipo de substâncias desempenha nas plantas é praticamente desconhecida. Até agora tem sido comprovada ação tóxica sobre alguns insetos (VARANDA *et al.*, 1987) e que, uma classe de substâncias derivada por degradação oxidativa de triterpenos, os limonóides, são a causa do sabor amargo de algumas espécies, provocando uma rejeição por parte dos herbívoros (HARBONE; BAXTER, 1983). Porém, é cada vez maior o número de trabalhos que atribuem atividades biológicas aos triterpenos, como por exemplo: atividade antimicrobiana, antiinflamatória, citotóxica e ação em nível do sistema cardiovascular (MAHATO *et al.*, 1988).

Provavelmente o grupo mais amplamente distribuído dos triterpenos pentacíclicos é representado pelos esqueletos ursano e oleano (figura 2). Existem ainda quatro esqueletos adicionais: lupano, friedoursano, friedooleano e gamacerano (figura 2). Algumas variações nos tipos principais são conhecidas como ácido ceanótico, serratenediol e as limoninas (ou meliacinas) (MAHATO *et al.*, 1988).

TRITERPENOS TETRACÍCLICOS



TRITERPENOS PENTACÍCLICOS

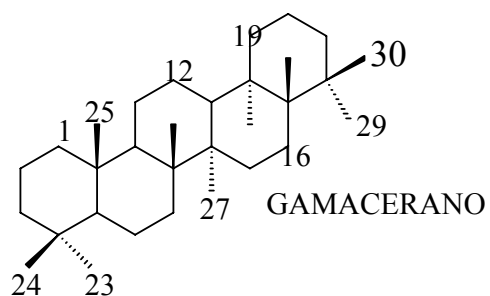
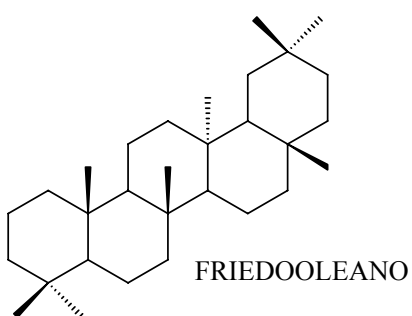
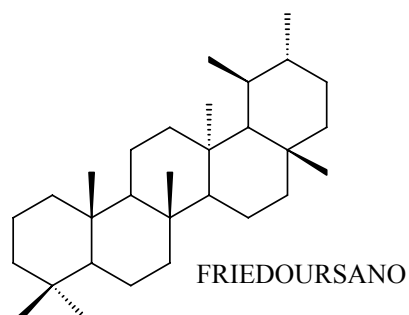
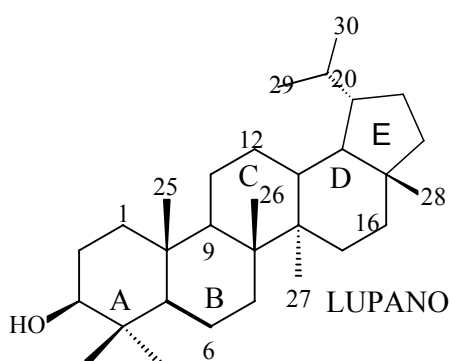
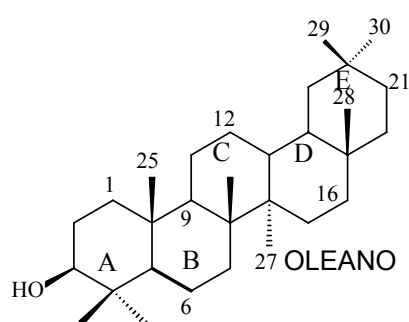
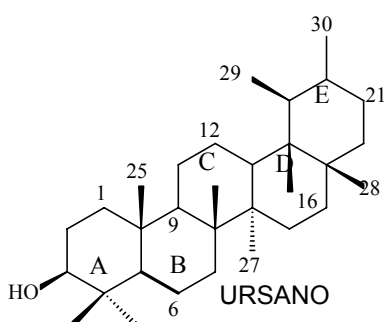


FIGURA 2: ESTRUTURA QUÍMICA DE TRITERPENOS COM ESQUELETO TETRACÍCLICO E PENTACÍCLICO.

A elucidação estrutural destes compostos tem normalmente ocorrido por técnicas de RMN ^{13}C (tabela 2), pois uma das grandes diferenças entre um espectro de RMN ^{13}C e um RMN ^1H é que o primeiro apresenta valores de deslocamento químico para os átomos de carbono numa faixa de aproximadamente 250 ppm, e o segundo apresenta valores de deslocamento químico para os átomos de hidrogênio numa faixa de aproximadamente 15 ppm. Esta diferença torna-se muito importante na análise de compostos saturados, que possuem um número de átomos de hidrogênio bem maior que o número de átomos de carbono (HARBONE; BAXTER, 1983).

O espectro de RMN ^1H mostraria uma grande acumulação de sinais numa faixa estreita, de aproximadamente 2 ppm, enquanto que o espectro de RMN ^{13}C espalharia a maior quantidade de sinais numa faixa maior, de aproximadamente 60ppm, permitindo obter as informações de uma maneira mais clara.

Sobre os triterpenos existem abundantes informações sobre deslocamentos químicos, estudos estereoquímicos, comparação de isômeros, etc, baseados nesta técnica (OLEA; ROQUE, 1990).

Dentro da ampla variedade destas substâncias, existe uma quantidade significativa de triterpenos que podem ser considerados de estrutura simples, que apresentam como características comuns um grupo funcional oxigenado apenas no carbono três, ou neste carbono e em algum dos grupos metila, e uma única ligação dupla.

Provavelmente a simplicidade da mistura destes triterpenos é o que permite encontrá-los freqüentemente nas plantas, e comumente vários deles numa mesma espécie. Essas características comuns fazem com que os triterpenos apresentem o mesmo comportamento frente a diferentes técnicas cromatográficas convencionais, como é a cromatografia em coluna, a CCDC e a CCDP.

Deste modo, a extração destes triterpenos a partir das plantas produz misturas complexas deles, cuja separação se torna muito difícil e conseqüentemente a identificação dos mesmos é também dificultada. Como freqüentemente estes triterpenos simples têm apenas uma ligação dupla, os valores dos deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C dos carbonos sp_2 dão uma informação inicial sobre os tipos de esqueletos carbônicos dos triterpenos existentes na mistura, mostrado nas tabelas 2 e 3 onde está apresentado os valores de δ mais habituais para as posições em questão. Em seguida, a comparação dos outros valores de deslocamentos

químico, sobretudo dos carbonos metínicos e metílicos leva a confirmar, com certa segurança, os constituintes da mistura.

TABELA 2: VALORES CARACTERÍSTICOS DE RMN ^{13}C (PPM, CDCl_3) DOS ÁTOMOS DE CARBONO na função Oxigenada.

| Carbono tipo | Deslocamento Químico (ppm) |
|--|----------------------------|
| C(3) – OH (α) | $76,1 \pm 0,5$ |
| C(3) – OH (β) | $78,6 \pm 0,5$ |
| C(3) – OAc (β) | $80,6 \pm 0,4$ |
| C(3) – OCH ₃ (β) | $88,7 \pm 0,1$ |
| C(3) – OCH ₃ (β) | $57,5 \pm 0,1$ |
| C(3) – O ₂ CH ₃ (β) | $170,6 \pm 0,3$ |
| C(3) – O ₂ CCH ₃ (β) | $21,2 \pm 0,2$ |
| C(3)=O | $216,8 \pm 1,2$ |
| C(28)O ₂ H | $181,1 \pm 2,3$ |
| C(28)O ₂ CH ₃ | $177,3 \pm 0,8$ |
| C(28)O ₂ CH ₃ | $51,4 \pm 0,2$ |

TABELA 3: VALORES CARACTERÍSTICOS DE RMN ^{13}C DE CARBONOS SP² EM TRITERPENOS

| Dados observados (ppm) | Triterpenos |
|----------------------------|--|
| 157,9(s); 117,0(d) | D-friedoolean-14-eno |
| 154,3(s); 107,0(t) | Urs-20(30)-eno |
| 151,5(s); 115,9(d) | D:C-friedo-B':A'-neogamecer-9(11)-eno |
| 150,5(s); 109,3(t) | Lup-20(29)-eno |
| 148,7(s); 114,8(d) | Lanosta-9(11),24-dieno |
| 146,0(s); 117,7(d) | Lanosta-7,24-dieno(13 α , 14 β) |
| 130,8(s); 125,1(d) | |
| 142,7(s); 120,1(d) | Lanosta-7,9(11)-dieno |
| 145,9(s); 116,3(d) | |
| 145,4(s); 116,4(d) | D:C-friedours-7-eno |
| 145,3(s); 117,3(d) | Lanost-7-eno |
| 145,1(s); 121,7(d) | Olean-12-eno |
| 142,6(s); 129,8(d) | Olean-18-eno |
| 141,9(s); 131,0(s) | B':A'-neogamacer-13(18)eno |
| 140,4(s); 122,7(s) | A'-neogamacer-21-eno |
| 140,0(s); 136,0(s) | A'-neogamacer-17(21)-eno |
| 139,6(s); 118,8(d) | Urs-20-eno |
| 139,4(s); 124,1(d) | Urs-12-eno |
| 134,6(s); 134,2(s) | D:C-friedours-8-eno |
| 134,4(s); 134,2(s) | Lanost-8-eno |
| 134,1(s); 133,6(s) | Lanost-8-eno (13 α , 14 β) |
| 134,1(s); 133,3(s) | Lanosta-8,24-dieno (13 α , 14 β) |
| 130,0(s); 125,2(d) | |
| 130,8(s); 125,4(d) | 9,19-ciclolanost-24-eno |
| Sem ligação dupla, 6,8(q) | D:A-friedoolean-3-ona |
| Sem ligação dupla, 20,0(s) | 9,19-ciclolanostano |

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Esta planta é originária da Europa meridional, com o transcurso dos anos tem se estendido a numerosos países, tanto no velho mundo como na América (WULF; MALLEVA, 1969).

A *Calendula* é uma espécie descrita pelo botânico sueco Carl Von Linné, a qual responde pelo binômio *Calendula officinalis* L., sendo conhecido apenas um sinônimo: *Caltha officinalis* Moench (WULF; MALLEVA, 1969).

2.1 POSIÇÃO TAXONÔMICA

SEGUNDO CRONQUIST (1988):

Reino – *PLANTAE*

Divisão – *MAGNOLIOPHYTA*

Classe - *MAGNOLIOPSIDA (DICOTILEDONEA)*

Sub-classe – *ASTERIDAE*

Ordem – *ASTERALES*

Família – *ASTEARACEAE*

Gênero - *CALENDULA*

Espécie – *Calendula officinalis*

2.2 SINOPSE DA FAMÍLIA ASTERACEAE

Antiga família Compositae (CORREA *et al.*, 1994), atualmente classificada como Asteraceae (ESCHRICH, 1997), compreende cerca de 1.100 gêneros e 25.000 espécies (BARROSO, 1986), a família Asteraceae é composta por plantas herbáceas e arbustivas, podendo ser anual ou perene (JOLY, 1979). Representam um grupo recente, possivelmente surgido no final do Oligoceno (CRONQUIST, 1977), tendo origem no Novo Mundo, diferenciação na América do Sul e posterior migração em direção ao norte (STUESSY, 1977).

A grande maioria dos gêneros (cerca de 98%) é constituída por plantas de pequeno porte (JOLY, 1991), somente nas zonas tropicais e subtropicais chegam a formar arbustos e até árvores (SCHULTZ, 1988)

As folhas geralmente são inteiras ou ligeiramente denteadas (SCHEFFER, 1989), imitando a forma de espátula (PENNA, 1921), porém nunca compostas, podendo ser opostas, alternas ou verticiladas. Possuem tricomas glandulares que

secretam óleos essenciais. Encontram-se também glândulas no tecido foliar (JOLY, 1979).

A inflorescência é do tipo capítulo, o qual é constituído por um receptáculo achatado, côncavo ou convexo, sobre o qual se inserem flores séssil sendo o conjunto envolvido por brácteas involucrais denominadas filárias. As flores são de simetria radial ou zigomorfa até bilabiadas.

As Asteraceae possuem interesse econômico considerável, pelo fato de seus representantes serem empregados, por exemplo, na alimentação, na medicina, na fabricação de cosméticos, corantes e inseticidas, e na produção de ictiotóxicos e plantas ornamentais (LAWRENCE, 1951; HUTCHINSON, 1973; DILLON, 1980). A família é a única representante das Asterales, uma das 11 ordens de asteridae, a subclasse mais avançada das Magnoliopsida. O sucesso evolutivo do táxon parece ser devido ao grande número de compostos de defesa que apresenta, do que propriamente à sua morfologia floral especializada (CRONQUIST, 1981). Observam-se a tendência de acúmulo de poliacetilenos, diterpenóides, lactonas sesquiterpênicas, alcalóides e flavonóides, muitos conferindo vantagem seletiva às espécies produtoras, à medida que protegem contra herbivoria e invasão de microrganismos (SWAIN, 1963; HERZ, 1968; VICKERY, 1981; SEAMAN, 1982; ABAD *et al.*, 1995). Iridóides e alcalóides do tipo benzil-isoquinolínicos não estão presentes na família (CRONQUIST, 1981).

De acordo com o sistema proposto por JEFFREY (1978), as Asteraceae são divididas em 2 subfamílias e 17 tribos: a sub-família Lactucoideae, compreendendo as tribos Lactuceae, Mutisieae, Eremothamaneae, Arctotideae, Carduceae, Vernonieae, Liabeae e Eupatorieae; e a subfamília Asteroideae, englobando as tribos Senecioneae, Tageteae, Heliantheae, Inuleae, Anthemideae, Ursineae, Calenduleae, Cotuleae e Astereae.

2.3 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O GÊNERO CALENDULA

O nome botânico provém do latim *calendulae* ou *calends* e significa o primeiro dia do mês, enfatizando o longo período de floração (STUART, 1979).

Nas flores observa-se um capítulo com receptáculo uniforme e vários verticilos de flores femininas. É comum serem estéreis na margem da inflorescência. A corola destas flores é ligulada, grande e tem a função de aparelho chamariz, para

atrair os insetos, podendo assim imitar as pétalas de uma flor individual. No centro da inflorescência há hermafroditas, actinomorfas, unicamente destinadas à reprodução. A disposição descrita encontra-se em muitos gêneros, não, porém em todas. Existem todas as disposições, teoricamente possíveis, com ou sem diferenciação em aparelho chamariz e reprodutor. Pode haver no mesmo capítulo flores todas do mesmo sexo, unissexuais e todas iguais entre si, bem como flores femininas e masculinas e ainda pode haver flores femininas e hermafroditas, ou masculinas e hermafroditas. O cálice das flores individuais é sempre pouco desenvolvido, sendo aderente ao tubo corolínico. Muitas vezes se transforma numa roda de cerdas persistente, destinadas a transportar o fruto, funcionando como um pequeno paraquedas denominado papo. O ovário é ínfero, formado por dois carpelos sincarpas que constituem um ovário unilocular, com um único óvulo. Produz um aquênio de forma variável, conforme a espécie (SCHULTZ, 1988).

2.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE A *Calendula officinalis* L.



FIGURA 3: FOTO DA FLOR DE *Calendula officinalis* L. (ASTERACEAE)

2.4.1 NOMES POPULARES

A planta *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) é conhecida popularmente como calêndula; maravilha; bem-me-quer; mal-me-quer; mal-me-quer-amarelo;

margarida dourada; flor de todo ano; maravilha dos jardins; flor de cemitério; erva-do-sol entre outros (SCHEFFER, 1989; FONT-QUER, 1987; STUART, 1979; CASTRO, 1981; PENNA, 1921; JOLY, 1991).

2.4.2 HÁBITO

Planta herbácea, anual, caule ereto, anguloso e ramoso. Folhas alternas, as superiores lanceoladas e as inferiores oblongo-lanceoladas. As inflorescências são grandes, dispostas em capítulos solitários. A coloração das pétalas (língulas) varia do amarelo ao laranja. Os frutos são do tipo aquênio, arcados e providos de pontuações sobre o dorso (CORREA JÚNIOR *et al.*, 1991).

2.4.3 CARACTERÍSTICAS BOTÂNICAS GERAIS

RAÍZ – É considerada uma raiz longa (KEVILLE, 1995). É constituído por uma raiz cabeluda, amarelo pálido, com forma cilíndrica (BALBACH, 1968), haste direita angular e ramosa (PENNA, 1921).

CAULE – apresenta um caule robusto e anguloso (SCHEFFER, 1989) ereto de 35 a 70 cm (CORREIA *et al.*, 1994), podendo ainda ser ramoso e aveludado (CASTRO, 1981), com hastes espessas, onde se inserem as folhas (CORREA *et al.*, 1994). Possui 15-20 cm de altura (CHATONET, 1983)

FOLHAS - Possui folhas inteiras ou denteada e calosa (FONT-QUER, 1987; SCHEFFER, 1989), as inferiores oblongas, as superiores espatuladas (CASTRO, 1981), sendo entradas ligeiramente sinuosas, alterando saliências (URIBE; GIMENEZ, 1990). As folhas superiores possuem um pouco de pubescência (CORREA *et al.*, 1994; FONT-QUER, 1987).

FLORES – São cultivadas como planta ornamental, que cresce facilmente e serve para decorar o jardim ou até mesmo pequenos vasos (CORREA *et al.*, 1994). As flores brotam nas extremidades das hastes e tem 4 a 5 cm de diâmetro (SCHEFFER, 1989). O botão central possui de 15 a 20 língulas ao redor, muito estendidas ao sol, de coloração amarelo às vezes alimonado ou alaranjado, de acordo com a variedade. A língula produz fruto e as flores do botão central, não (FONT-QUER, 1987). As pétalas centrais das flores são tubulosas e as periféricas liguetadas (CORREA *et al.*, 1994). Geralmente se prefere os cultivares dobrado vermelho alaranjado escuro (STARÝ, 1992; VOLÁK; STODOVA, 1990), sendo estas

as mais recomendadas pela farmacopéia (ARMOND, 1998). Possui aroma brando e pouco agradável e sabor a princípio adocicado e depois amargo (PENNA, 1921).

SEMENTES - As sementes, que na verdade são frutos, têm uma forma curiosa, arqueada (SCHEFFER, 1989), ligeiramente curvo (PENNA, 1921), em arco ou círculo (CASTRO, 1981).

2.4.4 CARACTERÍSTICAS DE CULTIVO

CLIMA - O clima deve ser temperado, aproximadamente 28 °C, solo drenado e rico em nutrientes orgânicos. Deve-se evitar alagamento, pois o excesso de água é prejudicial para seu desenvolvimento (ROSESTELATO, 1996).

SOLO - Vegeta facilmente em solos bem estruturados, originários da decomposição orgânica (SCHEFFER, 1989).

ESPAÇAMENTO - Recomenda-se 40 a 50 cm de espaçamento (SCHEFFER, 1989).

GERMINAÇÃO - Precisam do escuro para germinar (SCHEFFER, 1989; KEVILLE, 1995), ocorrendo este em 24 dias (SCHEFFER, 1989).

TEMPERATURA - Variando de 20 a 30 °C (SCHEFFER, 1989).

pH DO SOLO - 5,8 (ROSESTELATO, 1996).

COLHEITA - Da calêndula é colhida somente as flores (capítulos florais). Como a planta emite flores por um longo período, as colheitas devem ser feitas regularmente, colhendo-se somente as flores totalmente desenvolvidas, ainda sem início de formação de "sementes", com um mínimo de pedúnculo. A colheita deve ser feita após a evaporação do orvalho (SCHEFFER, 1989). A colheita das flores promove o florescimento (KEVILLE, 1995)

SECAGEM - A secagem pode ser feita em galpão ou estufa. Nesta, a temperatura não deve ultrapassar 35 graus (SCHEFFER, 1989).

ESSÊNCIA - Contém ao redor de 0,002 % de óleo essencial (SCHEFFER, 1989). Segundo STARÝ (1992) o teor de óleo essencial varia de acordo com a coloração das flores, sendo que o teor médio de essência obtida das flores amarelas foi de 0,0277 % e das alaranjadas de 0,0435 % de óleo essencial.

2.4.5 CARACTERÍSTICAS FARMACOGNÓSTICAS

2.4.5.1 Descrição macroscópica das flores

A *Calendula officinalis* é uma planta mais ou menos pilosa, de 30 a 60 cm de altura. Apresentam capítulos florais largos com uns 4 cm de diâmetro (SCHEFFER, 1989), terminais, solitários, encontrados no alto de cada ramo (BRITISH PHARMACOPEIA, 1953).

As folhas apresentam-se oblongas, agudas, um tanto suculento, largas, um pouco cordatas na base, parte superior lanceolada, margens internas com frequência híspidas, com pequenos fiapos. O caule errante, com 15-45 cm de altura, possui numerosas ramificações, apresenta-se estriado, verde, suculento e pubescente. As raízes são fibrosas (BRITISH PHARMACOPEIA, 1953).

As flores são desprovidas de ovário, corola amarelo brilhante ou alaranjada, com 15-25 mm de comprimento e 3 mm de largura, 1-3 denteada com quatro a cinco nervuras, margem quase inteira, tubo pubescente freqüentemente fechando os vestígios do estilete filiforme e do estígma bifido; ovário oblongo, 0,5 mm de comprimento, pubescente. Odor fraco e aromático, sabor salgado e levemente amargo (BRITISH PHARMACOPEIA, 1953).

2.4.5.2 Descrição microscópica das flores

Microscopicamente, o fragmento da corola apresenta-se com células da epiderme alongadas e arredondadas, onde o ponto de ligação é em forma de raiz. A epiderme mostra-se de forma irregular com numerosos estômatos dispersos. Apresenta ainda os grãos de pólen em grande número e espinhosos com 40 µm de diâmetro com três poros e exima espinhosa (BRITISH PHARMACOPEIA, 1953)

Caracteriza-se como pó amarelo, consistindo de fragmentos de flores. Células epidérmicas estreitas, alongadas com paredes sinuosas, cromoplastídeos irregulares e algumas vesículas de óleo, pêlos não glandulares bisseriados, com 1-2 células no ápice de até 900 µm de comprimento; cristais de oxalato de cálcio de 2-6 µm de diâmetro (BRITISH PHARMACOPEIA, 1953).

2.4.6 CONSTITUIÇÃO QUÍMICA DE *Calendula officinalis*

Os princípios ativos extraídos de plantas medicinais têm demonstrado que o teor destes pode variar em função da temperatura, duração da extração e o tipo de

solvente (TEGLIA, 1989), além da influência dos fatores ambientais como clima, solo, época de coleta, estágio de crescimento da planta, que podem influenciar na composição química de plantas (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

Entre os compostos mais investigados, devido sua importância na farmacologia, está:

Carotenóides

A planta possui um conteúdo de 0,078 e 0,017 % de carotenóides totais nas flores liguladas e nos receptáculos respectivamente (OCIOSZIYNSKA, 1977). Entre os compostos identificados, podemos citar: carotenóides (α , β e γ -caroteno), violaxantina, rubixantina, citroxantina, flavocromo, flavoxantina, galenina, luteína, licopeno, valentiaxantina, auroxantina, microxantina, 5,6 epoxicaroteno, β -zeacaroteno, mutatoxantina e luteína epóxido (ANDREEVA, 1961).

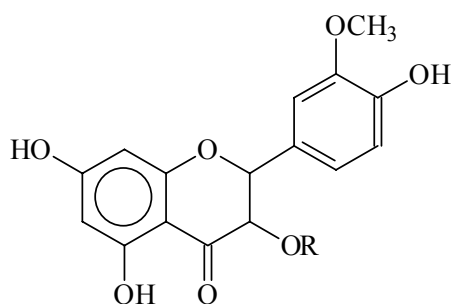
Classe dos Flavonóides

Em relação aos flavonóides estes se encontram na faixa de 0,88 e 0,33% de flavonóides totais em flores liguladas e receptáculos respectivamente (HADSON, 1985). Segundo MASTEROVÁ (1991), os flavonóides glicosídicos são os principais constituintes com efeito antiinflamatório da *C. officinalis*.

Isorhamnetina, isoquercitrina e quercitina são flavonóides já isolados da *C. officinalis* (KOMISSARENKO, 1988), além de glicosídeos flavônicos derivados de isoramnetina, como por exemplo: isoramnetina neohesperidosídeo, quercitina neoheperidosídeo, rutina 2^G-ramnosilrutinosídeo (VIDAL-OLIVIER, 1989), isorhamnetina-3-O-rutinorhamnosídeo (TEGLIA, 1989), embora os maiores glicosídeos sejam CAL 1, CAL 2 e CAL 3 (BEZAKOVA *et al.*, 1996).

Também foram encontrados dois triglicosídeos derivados da isoramnetina nas flores de *C. officinalis* sendo: isoramnetina 3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-O-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopiranosídeo e isoramnetina-3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 6)-O- β -D-glucopiranosídeo (narcissina) (MASTEROVÁ, 1991) (figura 2)

Derivados flavônicos como calendoflasídeo, calendoflavosídeo e calendoflavobiosídeo também foram isolados (KOMISSARENKO, 1988) (figura 2).



R = H (Isoramnetina)

R = Glc: Isoramnetin-3-O- β -D-glucopyranoside (CAL 1)

R = Rha-Glc: Isoramnetin -3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-O- β -D-glucopyranoside (CAL 2)

R = Rha-Rha-Glc: Isoramnetin-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranose (CAL 3).

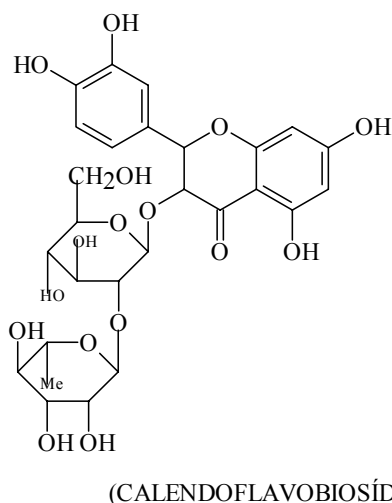
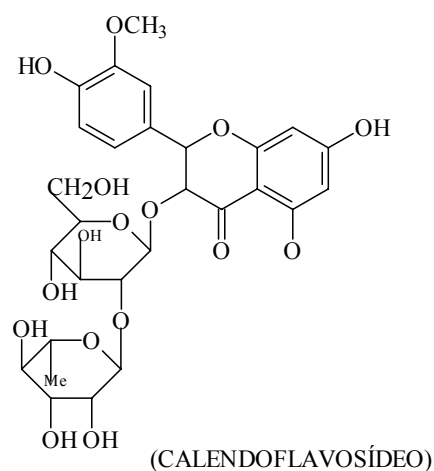
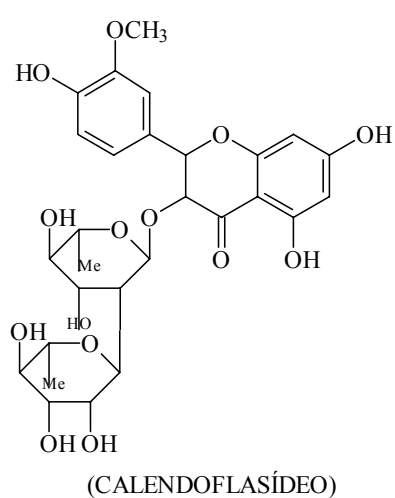


FIGURA 4: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE FLAVONÓIDES ISOLADOS DE *C. officinalis*.

Óleo Essencial:

Para a flor de Calendula obtém-se um rendimento médio de aproximadamente 0,02%, para as flores liguladas 0,12% e para o receptáculo, 0,4% (OCIOSZIYNSKA, 1977).

A composição química do óleo essencial foi determinada por GRACZA (1986), sendo que ao óleo essencial, principalmente os constituintes álcoois e lactonas terpênicas, foi associada uma boa atividade tricomonocida, sendo efetivo no tratamento da leucorréia. A composição do óleo essencial é constituída de mentona, isomentona, cariofileno, uma epoxide e cetona derivado, pedunculatina, α e β ionona, um derivado epoxido β -ionona e dihidroactinidiolida (figura 3).

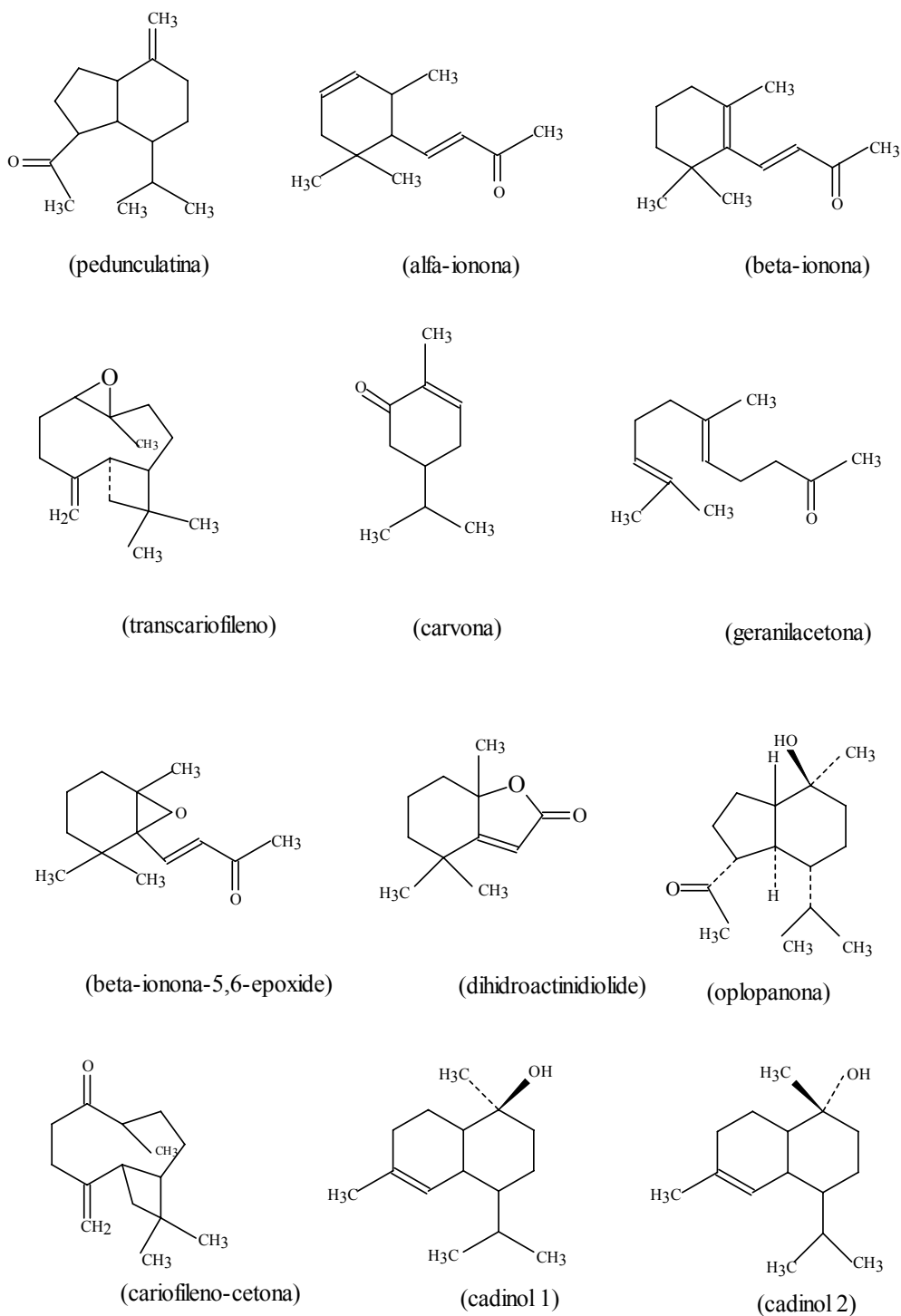


FIGURA 5: COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *C. officinalis*.

Classe dos Terpenóides

Os triterpenos são encontrados nos brotos, folhas jovens e botões florais (CUBAS, 1990), sendo importantes princípios antiinflamatórios da *C. officinalis* (DELLA LOGGIA *et al.*, 1994).

As sementes germinadas possuem a capacidade de sintetizar compostos triterpênicos com estruturas do tipo oleano, ursano e lupano, além do próprio ácido oleanóico que é transportado das sementes para as raízes da calêndula (CUBAS, 1990).

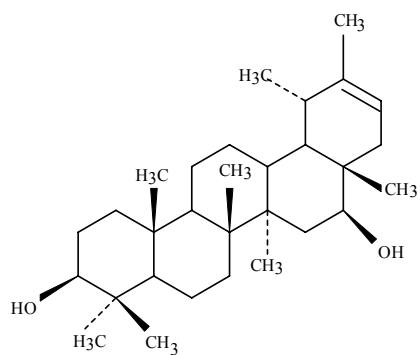
Encontra-se ainda em grande quantidade o faradiol, taraxasterol, Ψ -taraxasterol, calenduladiol, β -amyrin, α -amyrin, arnidiol e lupeol (DELLA LOGGIA *et al.*, 1994) (figura 4), faradiol mirístico ester e faradiol palmitico ester (ZITTERLEGLSEER *et al.*, 1997) (figura 5).

Os terpenos clofodiol e maniladiol também foram isolados e tiveram suas estruturas determinadas. (CUBAS, 1990).

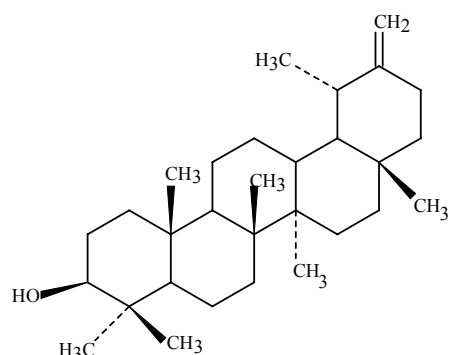
VIDAL-OLIVIER (1989) descreve diversas saponinas isoladas das flores de *C. officinalis*, como: calendulosídeo F (nas raízes), saponosídeos A, B, C, D, E identificados por HPLC. Em 1990, VIDAL-OLLIVIER cita que o ácido oleanóico 3-O-beta-D-glucoronídeo é a unidade básica dos saponosídeos.

Nas folhas e raízes foram encontradas glicosídeos triterpênicos, chamados calendulosídeo A, C, E, G, H (CUBAS, 1990).

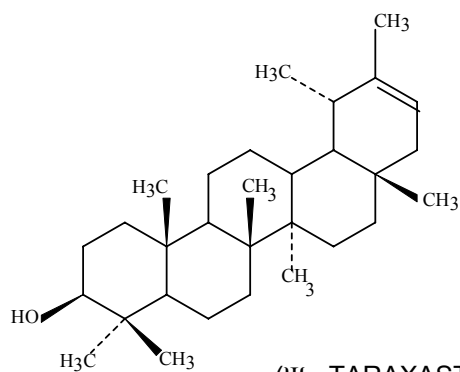
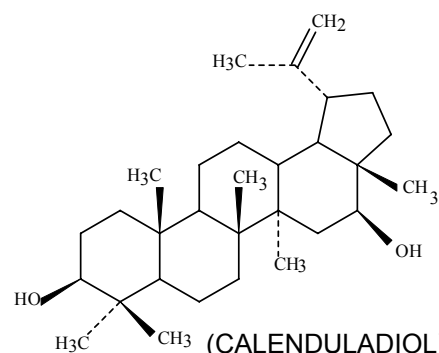
O ácido oleanóico também foi encontrado na forma livre em todas as partes da planta, principalmente nas folhas maduras e durante a floração (a partir daí é transportado para a parte subterrânea da planta). Concluiu-se que a produção deste ácido se dá em todo o crescimento da planta, inclusive submetendo os brotos a diferentes intensidades de luminosidade (CUBAS, 1990).



(FARADIOL)



(TARAXASTEROL)

(ψ - TARAXASTEROL)

(CALENDULADIOL)

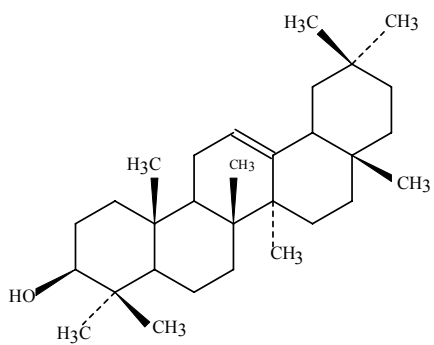
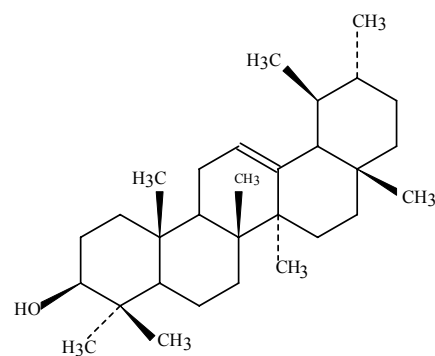
(β - AMIRINA)(α - AMIRINA)

FIGURA 6: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS TRITERPENOS FARADIOL, TARAXASTEROL, ψ -TARAXASTEROL, CALENDULADIOL, α E β -AMIRINA ISOLADOS DE *C. officinalis*.

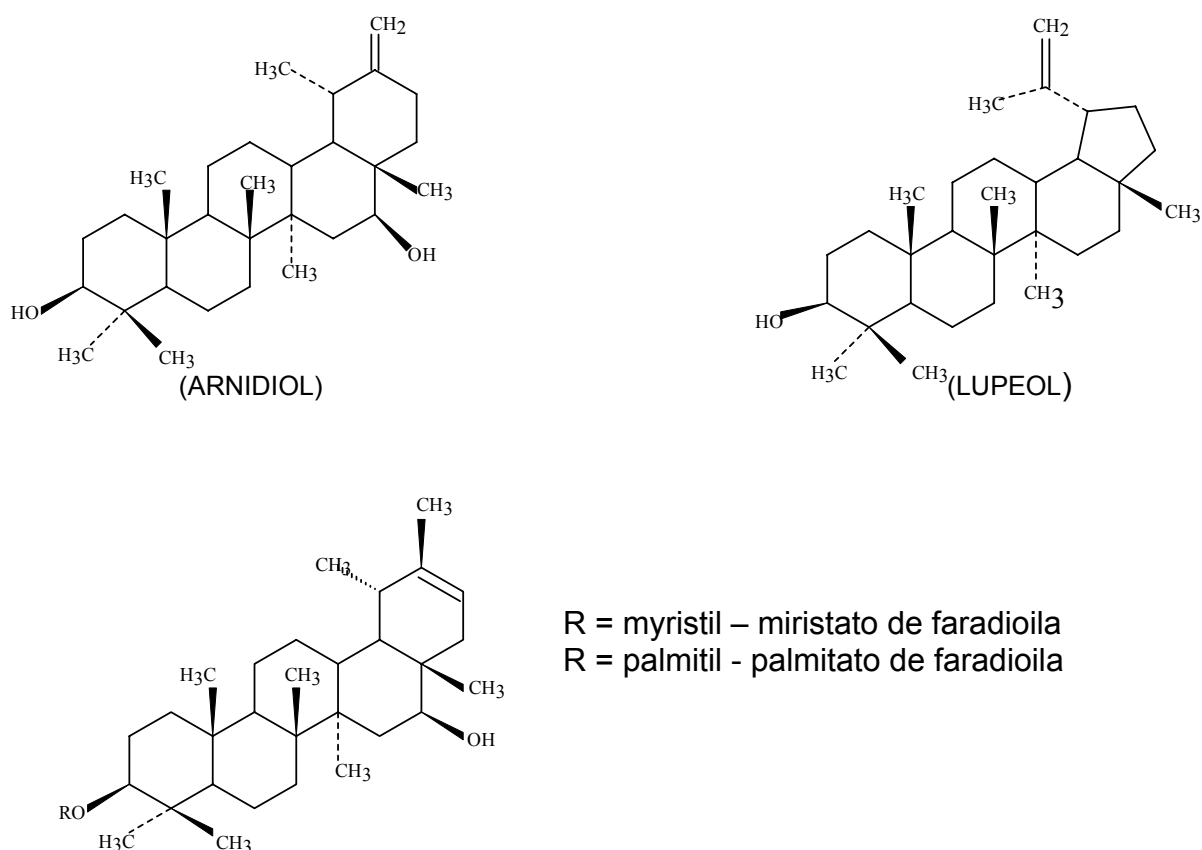


FIGURA 7: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS TRITERPENOS ARNIDIOL, LUPEOL, MIRISTATO E PALMITATO DE FARADIOL ISOLADOS DE *C. officinalis*.

Ácidos graxos e fenólicos

Há relatos ainda da presença de ácidos graxos livres (láurico, esteárico, palmitoleico, oleico e linoleico) e triacilglicerol nas sementes formado a partir do ácido linoleico. Além dos ácidos graxos, vários ácidos fenólicos também foram detectados como o p-hidroxibenzóico, p-cumarínico, gentísico, vanílico e cafeico salicílico (CUBAS, 1990)

3.4.7 ASPÉCTOS FARMACOLÓGICOS DE *Calendula officinalis*

3.4.7.1 Uso na medicina tradicional

Segundo reportado na literatura (ROIG, 1974), as decocções das flores de *Calendula* têm um amplo espectro no tratamento de diversas afecções, entre as quais podemos citar: no tratamento de feridas, como colutório nas estomatites, no tratamento de gastrite, úlcera, hepatite e outras enfermidades gastrointestinais; no tratamento da hipertensão, taquicardia e arritmia; no tratamento de diversas afecções do sistema urinário assim como enfermidades do SNC e periférico, entre outros.

De uma maneira geral, os extratos aquosos da *Calendula* apresentam as seguintes propriedades farmacológicas: cicatrizante, antiinflamatória, antibacteriana e tranqüilizante.

3.4.7.2 Estudos farmacológicos experimentais

Os estudos farmacológicos realizados com o extrato aquoso e frações a partir de *Calendula* têm comprovado as mesmas propriedades informadas na medicina tradicional.

WOJEICKI (1980) demonstrou que a aplicação diária durante 12 semanas dos saponosídeos das flores de *Calendula* em ratas com hiperlipemia experimental, em doses de 10 mg/Kg, normalizaram o colesterol, ácidos graxos livres, fosfolídeos, lípidos totais e triglicerídeos presentes no sangue. Em outro estudo, SAMOCHOWIECH (1983) comprovou que os saponosídeos isolados da *Calêndula* diminuíram o nível de colesterol, triglicerídeos e lípidos totais em ratas alimentadas com uma dieta aterogênica.

A separação e o isolamento de ésteres de faradiol das flores desta planta mostraram em testes farmacológicos atividade antiedematogênica no teste de edema induzido em orelha de rato. Ambos os ésteres do faradiol mostraram quase a mesma atividade antiedematogênica dose-dependente e nenhum efeito sinérgico significativo apareceu com a mistura (ZITTERL-EGLSEER *et al.*, 1997)

Extratos de flores secas de *C. officinalis* foram examinados pela inibição da replicação do vírus HIV-1. Ambos, extrato orgânico e aquoso, foram relativamente não tóxicos para os linfócitos humanos (células Molt-4), mas apenas o orgânico exibiu potente atividade anti-HIV em um ensaio *in vitro* do tipo MTT/tetrazolium. Em

adição, na presença do extrato orgânico (500µg/mL), as células Molt-4 não afetadas, foram completamente protegidas acima de 24 h de uma infusão e subsequentemente morte, causada por co-cultivação com infecção persistente de células U-937/HIV-1. Foi também encontrado que o extrato orgânico de flores de *C. officinalis* causou um significativo redução dose e tempo dependente na transcrição de HIV-1 reversa. Estes resultados sugerem que o extrato orgânico das flores desta planta possui uma interessante atividade anti-HIV (KALVATCHEV *et al.*, 1997)

Estudo relativo à toxicidade do extrato aquoso da Calêndula foi ensaiado por MANOLOV *et al.* (1964) apresentando uma DL50 de 375mg/Kg e uma DL100 de 580mg/Kg, utilizando como via de administração a endovenosa e intra-peritoneal. Para o extrato hidroalcoolico das flores, a DL50 foi de 450mg/Kg pela administração subcutânea e de 526mg/Kg em rato na administração endovenosa (BOYADZHIEV; VISSH, 1964). O extrato etilenoglicolico das flores de Calêndula se mostrou não tóxico para ratos albinos na administração sub-cutânea na dose de 10mL/Kg (RUSSO, 1972). Não houve sinal de toxicidade depois da administração oral de 100mg/Kg do extrato hidroalcoolico (80%) em ratos (MASCOLO *et al.*, 1987). Nenhum sinal de irritação foi atribuído à aplicação tópica no rato de uma pomada contendo 5% de extrato de Calêndula (KLOUCHEK-POPOVA *et al.*, 1982).

Trabalhos realizados anteriormente (ELIAS *et al.*, 1990) para investigação da genotoxicidade se mostraram negativos quando seis saponinas isoladas de Calêndula foram ensaiados pelo teste de AMES, utilizando *Salmonella* TA 98 na concentração de 400 µL e na concentração de 5,0 µL. Entretanto PARKHURST e SOTOLZENBERG (1973) relatam para as saponinas presentes na Calêndula, propriedades espermaticida, antiblástica e abortivas. A mutagenicidade para o extrato fluido da Calêndula foi negativa quando ensaiada pelo teste com *Salmonella*, em cepas TA 1535, TA 1537, TA 98 e TA 100, com concentrações de 50 a 5.000 µg e pelo teste de micronúcleo em ratos pela administração oral na concentração de 1g/Kg por 2 dias (RAMOS *et al.*, 1998).

ROCAUD-MAITRE (1988) demonstrou a atividade antitumoral e citotóxica dos extratos de Calendula ricos em saponinas triterpênicas.

A atividade antibiótica contra *Staphylococcus aureus* e *S. fecalis*, *Klebsiela pneumoniae*, *Echerichia coli*, *Sarcina lutea*, *Candida albicans*, *Trichomonas vaginalis* foi atribuída aos flavonóides (TARLE & DVORZAK, 1989). A ação tricomonicida da

Calêndula foi relacionada aos terpenos oxigenados, desenvolvendo também alta atividade antibiótica (GRACZA, 1987). A ação também foi associada ao vapor emanado das flores frescas (PANDEY *et al.*, 1982). O extrato etanólico a 80% mostrou atividade antibacteriana especialmente contra *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus fecalis* (DUMENIL *et al.*, 1980).

3.4.8 COMPOSTOS QUÍMICOS ISOLADOS DE *Calendula officinalis* E SUA ATIVIDADE BIOLÓGICA

A compilação dos dados disponíveis na literatura, correlacionando os efeitos biológicos a diversas substâncias químicas isoladas, também presentes no extrato de *C. officinalis*, permitiu confirmar os diversos efeitos terapêuticos associados ao seu uso pela medicina popular.

Sua ação pode variar desde um efeito antisséptico, analgésico, antiinflamatório e cicatrizante até os efeitos a nível genético em células cancerosas e viróticas. As ações farmacológicas já relatadas na literatura estão resumidas na tabela 4.

TABELA 4: ATIVIDADE FARMACOLÓGICA RELACIONADA AO COMPOSTO QUÍMICO OU CLASSE DE COMPOSTOS ISOLADOS DE *C. officinalis*.

(continua)

| COMPOSTO | PARTE | AÇÃO FARMACOLÓGICA | REFERÊNCIA |
|------------------------------|--------|---|---|
| β - Sitosterol | flores | Hipolipoemiante | VALISENKO, 1982; MIRONIVA, 1982; SAMOCHOWIECH, 1983; HATINGUAIS, 1984 DUKE, 1985 |
| α -Amirina | flores | Antitumoral, citotóxico | GRENAND <i>et al.</i> , 1987; |
| Ácido gentísico | flores | Antiinflamatório, antioxidante, antireumático, antivirótico | HARBONE; BAXTER, 1983 |
| Ácido oleanólico | flores | Inibidor da síntese de estrógeno, Antialérgico, antibacteriano, anticarcinogênico, anti-HIV, antiinflamatório | GAMBER; SPIELLER, 1995; AQUINO <i>et al.</i> , 1991 |
| Ácido p-hydroxy- benzoico | flores | Fungistático, pesticida. | NIGG; SEIGLER, 1992 |
| Ácido salicílico | planta | Analgésico, antiartrítico, antibacteriano, antiinflamatório, antioxidante, antipirético, antisséptico | MADAUS, 1976 HUANG, 1993 |
| Ácido vanílico | Flores | Antihelmintico, antibacteriano, antiinflamatório, ascaricida, laxativo | HARBONE; BAXTER, 1983 DUKE, 1985 |
| Campesterol | flores | Hipocolesterolemico | DUKE, 1985 |
| Caryophyllene | flores | Antiedêmico, antiinflamatório | SHIMIZU <i>et al.</i> , 1990 |
| Faradiol | flores | Antiedematogênico, antiinflamatório (tópico e sistêmico), inibidor da lipoxigenase | DELLA-LOGIA <i>et al.</i> , 1994; ZITTER-EGLESEER <i>et al.</i> , 1997; BEZAKOVA <i>et al.</i> , 1996 |
| Isorhamnetin-3- glucoside | flores | Hepatoprotetor | CHANG <i>et al.</i> , 1985 |
| Kaempferol | planta | Antiherpético, antiinflamatório | AMOROS <i>et al.</i> , 1992 DUKE, 1985 |
| Lupeol | flores | Antihiperglicêmico, antimalárico, citotóxico | HARBONE; BAXTER, 1983 KHALID, <i>et al.</i> , 1986 DUKE, 1985 |
| Luteína | flores | Anticancerígena, antitumoral | MADHAVI <i>et al.</i> , 1988. |
| Lycopene | flores | Antitumor | DUKE, 1985 |
| Quercitina | planta | Inibidor da síntese de estrógeno, Alleloquímico, alergênico, antialzheimer, antibacteriano | GAMBER; SPITELLER, 1995; HARBONE; BAXTER, 1983 NEWMARK; SCHULICK, 2000 |
| Rubixantina | planta | Colorante | HARBONE; BAXTER, 1983 |
| Rutina | flores | Antibacteriano, antifepatotóxico, antioxidante, antihemorrodial | HARBONE; BAXTER, 1983 KEELER & TU, 1991 |
| Saponinas triterpênicas | flores | Normaliza colesterol, ácidos graxos livres, lipídeos, fosfolipídeos e betalipoproteínas | WOJCICKI, 1980 |
| Taraxasterol | Flores | Antiedêmico, antiinflamatório, antitumoral | YUSUKAWA, 1996, DUKE, 1985 |
| Violaxantina | planta | Colorante | HARBONE; BAXTER, 1983 |

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Realizar estudo biomonitorado da atividade antibacteriana da planta medicinal *Calendula officinalis* L. (Asteraceae), com o intuito de selecionar padrões analíticos que permitirão avaliar a qualidade de preparações fitoterápicas com propósito antibacteriano, enfatizando processos de extração, sazonalidade, toxicidade e mutagenicidade.

3.2 ESPECÍFICOS

- a) Investigar a atividade antibacteriana do extrato bruto, sub-frações e compostos isolados a partir de flores de *Calendula officinalis* bem como para cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus*;
- b) Isolar e caracterizar o(s) constituinte(s) químico(s) da fração que apresentar atividade antibacteriana e que possam ser empregados como marcadores químico-biológicos desta atividade;
- c) Avaliar o efeito da sazonalidade no perfil cromatográfico por CLAE e pela atividade antibacteriana de exemplares obtidos no decorrer dos meses do ano;
- d) Avaliar o efeito dos diferentes processos de extração no perfil cromatográfico por meio de CLAE e quantificar os marcadores químico-biológicos selecionados para a atividade antibacteriana por meio de cromatografia em fase gasosa acoplado com massas;
- e) Estudos biológicos:
 - Analisar o potencial toxicológico pelo estudo agudo e sub-agudo do extrato bruto da droga vegetal, administrado pela via intraperitoneal e oral;
 - Analisar o potencial mutagênico pelo teste de micronúcleos e de Ames.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ESPECIFICAÇÃO DOS EQUIPAMENTOS E MATERIAIS UTILIZADOS

- As análises em CCD analítica e preparativa foram efetuadas utilizando-se respectivamente, sílica gel 60 G e 60 PF₂₅₄, ambas da Merck[®], e reveladas com irradiação de lâmpada UV, em comprimento de onda de 254 e 365 nm; e/ou anisaldeído sulfúrico seguido de aquecimento;
- Nas separações cromatográficas em coluna, foi utilizado sílica gel G 60 (Merck) como adsorvente;
- Os meios de cultura utilizados foram da marca Oxoid ou Difco;
- Os solventes e reagentes utilizados durante os processos de fracionamento cromatográficos bem como nos ensaios biológicos, foram das marcas: Merck, Aldrich e Sigma, sendo que este último foi purificado por destilação antes do uso. Os solventes para análise em CLAE foram da marca Merck, grau Ominisolv;
- Os espectros de RMN foram obtidos em espectrofotômetro da AC-200 da Bruker, operando a 200 e 50 MHz para ¹H e ¹³C, respectivamente;
- Para avaliação em CLAE foi utilizado o equipamento Lachrom da Merck-Hitashi, utilizando-se bomba quaternária com fluxo de 1 mL/min e detector UV fixado em 215, 232, 274 e 430 nm. A coluna analítica foi Lichrospher[®] RP-18 250x4, injetor Reodhyne[®]. As amostras foram previamente filtradas em filtros Millipore[®] 0,45µ;
- Para avaliação em CG foi utilizado um cromatógrafo gasoso, modelo CG-17A da marca Shimatzu acoplado à um espectrômetro de massas modelo QP5050A também da marca Shimatzu, munido de uma coluna apolar DB5 (5% fenilmetilsiloxano) de 20 m x 0,25 mm de diâmetro interno;
- Vortex: marca Quimis, com agitação contínua;
- Moinho de facas analítico marca IKL;
- Balança para determinação de umidade marca Digimed;
- Ultrassom: marca Quimis;
- Forno Mufla: Marca IKL, com 5 patamares de aquecimento.

4.2 MATERIAL VEGETAL

Para o estudo foi utilizado o capítulo floral da planta, composto por lígulas, tubo floral e receptáculo. A planta foi coletada no mês de dezembro 2001, entre oito e dez horas da manhã, na região metropolitana no município de Ponta Grossa – PR.

Para o controle sazonal, a planta foi coletada uma vez ao mês (janeiro a dezembro do ano de 2002), no mesmo canteiro, no mesmo horário.

O exemplar de origem egípcia foi fornecido pela empresa importadora Santos Flora.

4.2.1 IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA

A espécie *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) foi identificada pela Prof. Dra. Rosemeri Moro, do departamento de Biologia, da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), onde há uma exsicata depositada no *Herbário* da UEPG, sob número 6483.

4.2.2 IDENTIFICAÇÃO MICROSCÓPICA DA PLANTA

Com o objetivo de se identificar microscopicamente algumas estruturas da planta foram realizados cortes histológicos nas partes da planta fresca como: folhas e flores (sépalas, receptáculo e pétalas). Os cortes obtidos foram previamente diafanizados com cloral hidratado.

Com o auxílio de microscópio ótico, foi possível observar algumas estruturas descritas nas farmacopéias brasileira e britânica.

4.2.3 AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DA PLANTA

Para as análises físicas, foram empregadas flores de *C. officinalis*, secas em estufa a 45°C e moídas em moinho de facas com tela de 3 mm.

4.2.3.1 Densidade aparente

A determinação da densidade aparente foi realizada em triplicata onde se preencheu uma proveta de 250 mL com a planta moída. O material vegetal utilizado foi pesado e foi calculada a sua densidade de acordo com a fórmula: $d = m.v^{-1}$, onde d = densidade, m = massa em g e v = volume em mL.

4.2.3.2 Determinação granulométrica

A determinação da granulometria foi realizada utilizando-se 50 g de amostra seca e moída, realizada em um jogo de 5 pratos com telas de 0,5; 0,35; 0,25; 0,15 mm e um fundo para depósito final.

4.2.3.3 Determinação de voláteis

A determinação dos voláteis totais foi realizada a 45 °C, e 105 °C (90 min em cada temperatura), em balança de infravermelho. A análise foi realizada pesando-se 2 g de droga seca e moída em um prato de alumínio específico para determinação de perda de massa.

4.2.3.4 Determinação do teor de água

Foi pesado 5 g da planta moída em um tubo de Falcon de 50 mL. A este foi adicionado 20 mL de metanol e macerado por 15 minutos. A seguir iniciou-se o processo de extração por turbólise. O extrato foi centrifugado e o sobrenadante transferido, por filtração em papel, para balão volumétrico de 50 mL. O processo extrativo foi repetido por mais duas vezes. O volume foi completado com metanol e o teor de água determinado no aparelho de Karl Fisher. A determinação foi realizada em triplicata.

4.1.3.5 Determinação do teor de cinzas

Foram utilizados seis cadinhos de porcelana, previamente tarados e calcinados, com alíquota de 2 g de planta moída. Estes foram levados ao forno mufla programado em gradientes crescentes de temperatura, composto por cinco patamares. Ao final de cada patamar de temperatura (com exceção da temperatura de 250 °C), os cadinhos foram resfriados em dessecador e suas massas foram determinadas em balança analítica.

4.3 CEPAS DE MICRORGANISMOS

Para o perfil de sensibilidade foram utilizadas cepas de bactérias mantidas em ágar Müller-Hinton a temperatura de 4°C, fornecidas pelo laboratório de microbiologia / Departamento de Biologia / Universidade Estadual de Ponta Grossa: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Micrococcus luteus* ATCC 9341; *Bacillus*

cereus; *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048; *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

As cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus*, provenientes de lesões infecciosas de pele, coletadas em centros de saúde municipais, conservadas em ágar Müller-Hinton a uma temperatura de 4°C, foram fornecidas pelo laboratório de microbiologia / Departamento de Análises Clínicas / Universidade Estadual de Ponta Grossa. As cepas foram identificadas bioquimicamente e o perfil de sensibilidade foi determinado por disco difusão (NCCLS, 2004).

4.4 INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Para os testes preliminares de sensibilidade foram analisadas as frações HEX, DCM, AcOEt, MeOH e EtOH 85%, bem como os compostos isolados e identificados, dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO), utilizando a metodologia de cavidade placa (CLEELAND *et al.*, 1991). A suspensão bacteriana em salina foi padronizada pelo tubo 0,5 da escala de McFarland e ajustado para 90% de transmitância (530nm), correspondendo aproximadamente 10^6 UFC/mL. Os ensaios foram submetidos a 37°C por um período de 24-48 horas. Para as frações foram utilizados 3,0 mg de cada extrato por cavidade. Para os compostos isolados foi determinado o MIC nas seguintes concentrações: 1000, 500, 250 e 125 µg/mL em DMSO. O experimento foi realizado em triplicata e foi utilizado como controle negativo um volume equivalente de DMSO e controle positivo, o antimicrobiano padrão Cloranfenicol (30µg/mL). Os diâmetros dos halos de inibição foram determinados pela média aritmética, em milímetros (mm). As frações HEX, DCM, AcOEt, MeOH e EtOH 85% também foram ensaiadas pela técnica do cilindro em placa (USP, 1990). Para tanto foram selecionados dois microrganismos gram positivo (*S. aureus* e *M. luteus*), empregando-se o volume de 150 µL das frações dissolvidas em DMSO, na concentração de 20 mg/mL.

O estudo da atividade antibacteriana frente a cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus*, foi realizado pela modificação do método de cilindro em placas (USP, 1990). Foi feita uma suspensão bacteriana das cepas em solução fisiológica 0,9%, utilizando cultura recente (24 horas). A concentração do inóculo foi padronizada segundo a escala 0,5 de MacFarland e ajustada em espectrofotômetro.

Uma cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi utilizada como controle. Em seguida as cepas foram semeadas em placas de ágar Müller-Hinton com swab e após quinze minutos foi adicionado o cilindro de aço inox (dois por placa) sobre a camada do ágar inoculado. Os testes foram realizados utilizando o extrato bruto e fração ativa na concentração de 30 mg/mL de DMSO. No interior de cada cilindro foi adicionado 150 µL de cada extrato. Como controle negativo foi utilizado volume equivalente de DMSO e controle positivo os antimicrobianos Ampicilina e Penicilina. Aguardaram-se alguns minutos e cuidadosamente as placas foram colocadas em estufa, sem empilhá-las. Todas as placas foram incubadas por 18-20 horas a 35°C. Foi considerado como possuidora de atividade antibacteriana, aquela fração que quando aplicada sobre o meio de cultura contendo a suspensão do microorganismo apresentou um halo de inibição, caracterizado por uma zona de clareamento que foi determinada em milímetros (mm). O teste t foi aplicado para comparar os diâmetros determinados entre o extrato bruto e a fração ativa.

4.5 OBTENÇÃO E FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS

Para a realização do experimento, foram utilizados extratos vegetais obtidos sob duas metodologias diferentes: extrato A e extrato B. Para ambos os extratos, foram empregadas flores de *C. officinalis*, secas em estufa a 45°C e moídas em moinho de facas com tela de 3 mm, posteriormente extraídas em aparelho de Soxhlet.

4.5.1 Extrato A (extrato bruto): Para a extração foram utilizados 50g de flores, utilizando como líquido extrator uma solução hidroalcoolica a 90%, com aquecimento em aparelho de Soxhlet por um período de 20 horas. Depois de evaporado o solvente remanescente, obteve-se um rendimento total do extrato bruto de 27g (54%). Este extrato foi utilizado para a investigação da atividade antibacteriana preliminar. Sob as mesmas condições foram preparados os extratos utilizados para o controle sazonal, coletado nos doze meses do ano, bem como o extrato proveniente da planta egípcia.

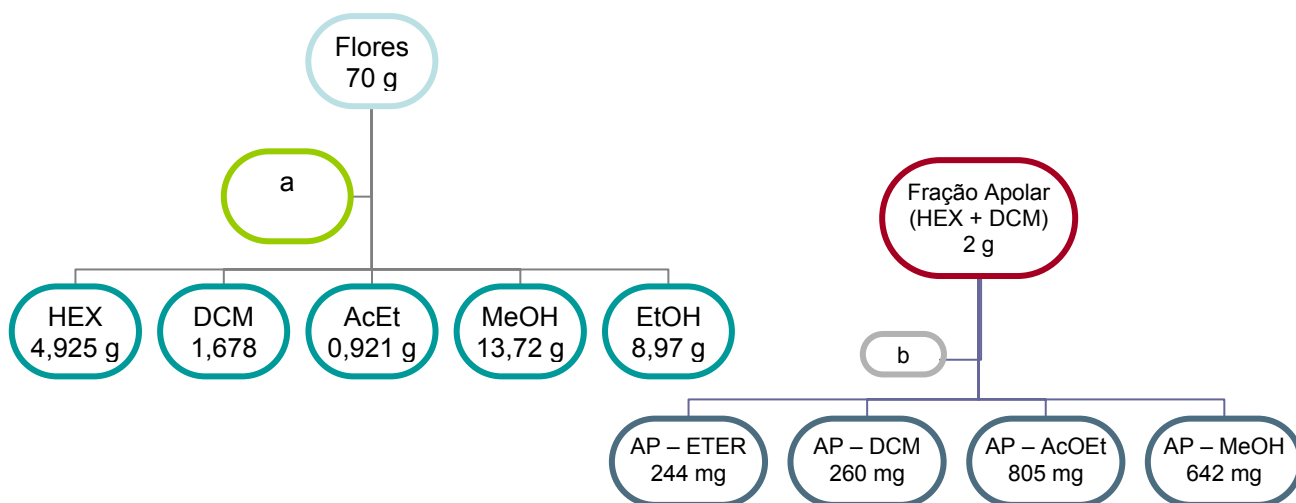
4.5.2 Extrato B (extração fracionada): Neste processo 70g de flores foram extraídas em aparelho de Soxhlet por 18 horas, empregando uma seqüência de solventes de

polaridade crescente: hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol e etanol 85% (500 mL de cada solvente). Depois de evaporado o solvente, as massas obtidas para os extratos hexano, diclorometano, acetato de etila, metanólico e etanólico foram respectivamente de 4,925g (7%), 1,678g (2,4%), 0,921g (1,3%), 13,72g (19,6%), 8,97g (12,81%). Ao final do processo extrativo, o material vegetal submetido à extração teve o solvente remanescente evaporado em estufa a 50°C, apresentando uma massa final de 40,5g (57,86%) (esquema 1).

Os extratos hexano e diclorometano foram reunidos por apresentarem perfil cromatográfico e espectroscópico semelhante bem como por possuírem um perfil de sensibilidade para os microrganismos testados bastante semelhantes (tabela 15, pág. 59).

4.5.3 Fracionamento da sub-fração apolar (HEX-DCM)

O extrato apolar, proveniente da reunião das frações hexânica e diclorometano, 2,0 g foi submetido à cromatografia em coluna filtrante (Silica gel, 230-400 mesh, Ø 3,0 / 18,0 cm) com solventes de polaridades crescentes, éter de petróleo, diclorometano, acetato de etila e metanol, e fornecendo as sub-frações Ap-Éter (244 mg), Ap-DCM (260 mg), Ap-AcOEt (805 mg) e Ap-MeOH (642 mg) (esquema 1).



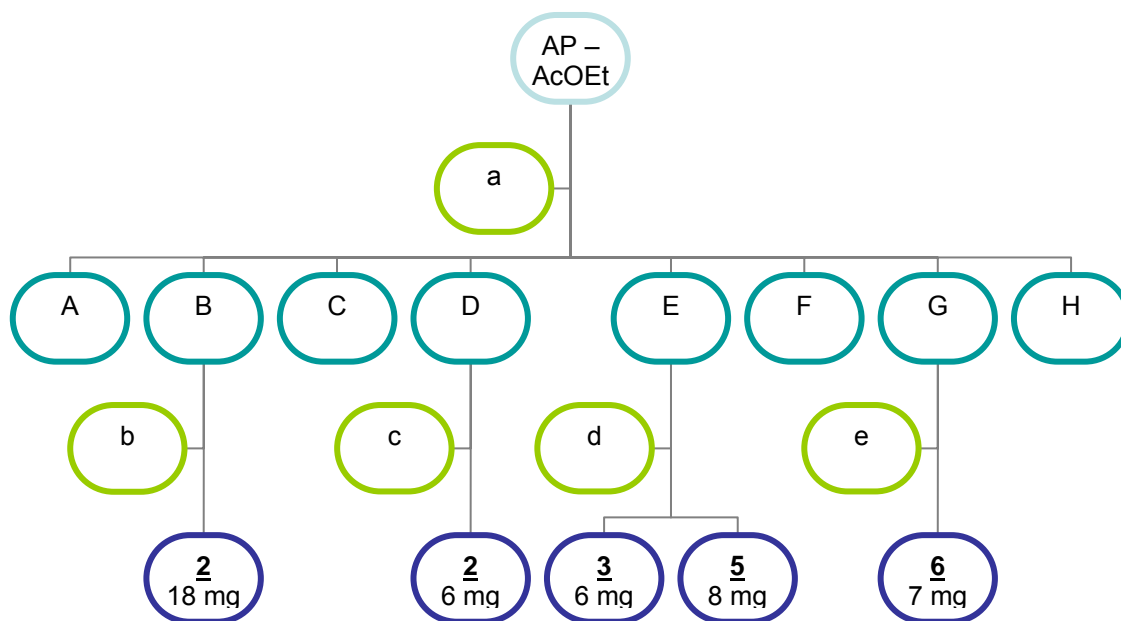
a = Soxhlet por 18 horas

b = coluna filtrante (Silica gel, 230-400 mesh, Ø 3,0 / 18,0 cm)

ESQUEMA 1: PROCESSO DE EXTRAÇÃO REALIZADO POR SOXHLET E SUB-FRACIONAMENTO POR COLUNA FILTRANTE DAS FRAÇÕES HEXÂNICA E DICLOROMETANO.

4.5.3.1 Fracionamento da sub-fração apolar (Ap-AcOEt):

A Sub-fração AcOEt (700 mg) foi submetida a cromatografia em coluna (Silica gel, 230-400 mesh, Ø 3,0 / 18,0 cm) usando solventes em gradiente de DCM/Hex/ AcOEt (8:1:1, 7:1:2, 6:1:3, 5:1:4), 250 mL de cada mistura. As frações foram analisadas por CCDC e reunidas em 8 frações (A – H). A fração B foi submetida a uma CCDP em Hex/DCM/AcOEt (7:2:1), eluida 2 vezes, e fornecendo o composto 2 (18 mg). A fração D foi submetida a CCDP em Éter petróleo/DCM/AcOEt (7:1,5:1,5), e fornecendo também o composto 2 (6 mg). A fração E foi submetida a CCDP em DCM/AcOEt/Isop (7:3:gts), eluida 2 vezes, levando ao isolamento dos compostos composto 3 (6 mg) e do composto 5 (8 mg). A fração G foi purificado em CCDP em Éter/DCM/AcOEt (8:1:1), eluido 2 vezes e resultou no isolamento do composto 6 (7 mg) (esquema 2).



a = gradiente de DCM/Hex/ AcOEt (8:1:1, 7:1:2, 6:1:3, 5:1:4), 250 mL de cada mistura

b = CCDP em Hex/DCM/AcOEt (7:2:1), eluido 2 vezes

c = CCDP em Éter petróleo/DCM/AcOEt (7:1,5:1,5),

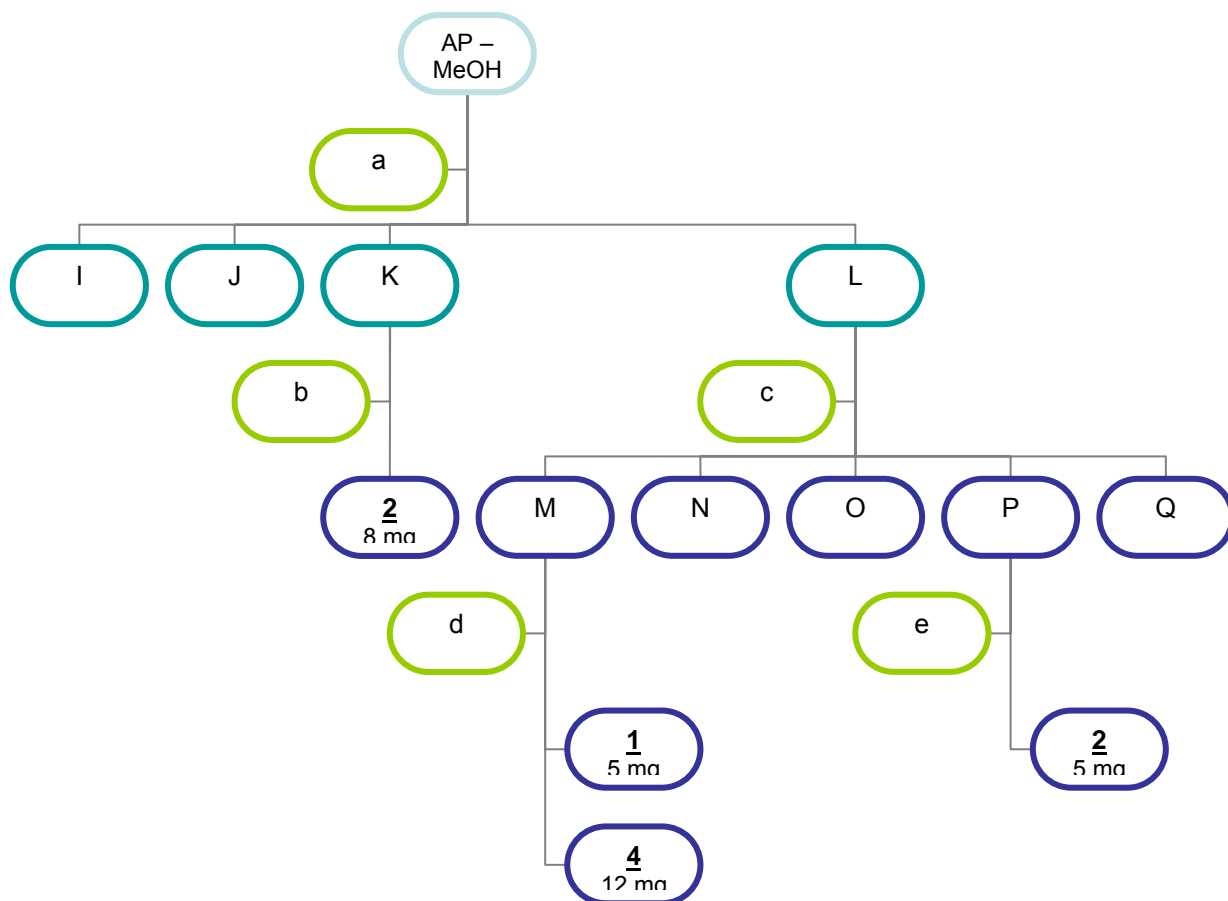
d = CCDP em DCM/AcOEt/Isop (7:3:gts), eluido 2 vezes

e = CCDP em Éter/DCM/AcOEt (8:1:1), eluido 2 vezes

ESQUEMA 2: FRACIONAMENTO PARCIAL DA FRAÇÃO APOLAR ACETATO DE ETILA (AP/AcOEt)

4.5.3.2. Fracionamento da sub-fração apolar (Ap-MeOH):

A Sub-fração Ap-MeOH (500 mg) foi submetida a cromatografia em coluna (Silica gel, 230-400 mesh, \varnothing 2,0 / 50,0 cm), usando como mistura de solventes em gradiente de Hex/DCM/AcOEt/MeOH (8:1:0,5:0,5, 7:1:1:1, 6:1:1,5:1,5, 5:1:2:2). As 68 frações obtidas foram analisadas por CCDC e reunidas em 4 frações (I – L). A fração K foi submetida a uma CCDP em Hex/DCM/Isop (8:1:1), eluida 2 vezes e fornecendo o composto **2** (8 mg). A fração L foi submetida a CC usando como solvente a mistura isocrática Éter/DCM/AcOEt (7:2:1). As frações foram analisadas por CCDC e reunidas em 5 frações (M – Q). A fração M foi submetida a CCDP com Hex/DCM/Isop (7:2:1), eluida 2 vezes e resultou no isolamento dos compostos **1** (5 mg) e **4** (12 mg). A fração P foi submetida a CCDP em Hex/DCM/Isop (8:2:gts), e resultou no isolamento do composto **2** (5 mg) (esquema 3).



a = gradiente de Hex/DCM/AcOEt/MeOH (8:1:0,5:0,5, 7:1:1:1, 6:1:1,5:1,5, 5:1:2:2), 300 mL de cada

b = em Hex/DCM/Isop (8:1:1), eluido 2 vezes

c = Éter/DCM/AcOEt (7:2:1).

d = CCDP com Hex/DCM/Isop (7:2:1), eluido 2 vezes

e = CCDP em Hex/DCM/Isop (8:2:gts),

ESQUEMA 3: FRACIONAMENTO PARCIAL DA FRAÇÃO APOLAR METANÓLICA (Ap/MeOH)

As substâncias isoladas foram identificadas pelos métodos espectroscópicos tradicionais: ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e de carbono-13 (RMN ^{13}C) e posteriormente por comparação com os dados reportados na literatura. Os triterpenos obtidos em mistura foram identificados segundo a metodologia descrita por OLEA e ROQUE (1990).

Os compostos isolados foram posteriormente utilizados como marcadores químico-biológicos no controle de qualidade da fitopreparação.

4.6 ANÁLISE COMPARATIVA DE DIFERENTES TÉCNICAS EXTRATIVAS

Devido ao fato de que tanto a composição química, como a atividade biológica pode ser influenciada pela metodologia adotada no processo de extração, foram preparados extratos vegetais a partir de três diferentes metodologias de extração (sonicação, agitação e maceração), empregando-se o mesmo solvente extrator (DCM). Os processos de extração foram comparados, de acordo com: rendimento, perfil cromatográfico em CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), atividade antibacteriana e análise quantitativa de marcador químico-biológico por CG-EM (Cromatografia Gasosa / Espectrometria de Massas).

4.6.1 Preparo dos extratos

I - Sonicação: foi utilizado 1,0 g de planta, extraído com 20 mL de DCM (3x). Cada extração foi realizada durante 15 minutos com 10 minutos de intervalo (3x) em temperatura ambiente;

II - Agitação: foi utilizado 1,0 g de planta moída, extraído com 20 mL de DCM (3x). Cada extração foi realizada sob agitação em Vortex durante 15 minutos com 10 minutos de intervalo (3x) em temperatura ambiente;

III - Maceração: foi utilizado 1,0 g de planta moída, extraído com 20 mL de DCM (3x). Cada extração foi realizada durante 24 horas durante 3 dias em temperatura ambiente.

4.6.2 Análise do rendimento dos extratos brutos

Após a extração, o solvente remanescente foi evaporado e a massa do extrato determinada. Os resultados foram expressos pela média de duas determinações.

4.6.3 Investigação do perfil de sensibilidade frente aos processos de extração

Os três processos de extração foram investigados sobre possíveis alterações da atividade antibacteriana, decorrentes do processo utilizado na extração. Foram empregados microrganismos patogênicos gram positivo e negativo. A metodologia empregada foi cavidade placa.

4.6.4 Avaliação do perfil cromatográfico dos processos extrativos

Avaliação do perfil cromatográfico por CLAE foi realizada em coluna RP-18 250x4 e fase móvel uma mistura de água (A) com pH ajustado para 3,0 com ácido ortofosfórico, acetonitrila (B) e metanol (C) (tabela 5), com fluxo de 1mL/min. Os extratos para análise foram preparados na concentração de 1mg/mL de MeOH. O volume de injeção foi de 20µL, com detector UV fixado em 215 nm, utilizando-se eluição na forma gradiente.

TABELA 5: SISTEMA DE ELUIÇÃO PARA ANÁLISE EM CLAE DOS PROCESSOS DE EXTRAÇÃO:

| Gradiente | | | |
|----------------|----|----|-----|
| Tempo (min) | A | B | C |
| 0 | 50 | 10 | 40 |
| 5 | 40 | 9 | 51 |
| 10 | 35 | 7 | 58 |
| 15 | 30 | 7 | 63 |
| 20 | 20 | 5 | 75 |
| 25 | 10 | 3 | 87 |
| 30 | 2 | 1 | 97 |
| 35 | 0 | 0 | 100 |

(A) Água (pH 3,0), (B) Acetonitrila e (C) Metanol.

4.6.5 Análise quantitativa dos compostos isolados por CG-EM

A determinação quantitativa dos compostos isolados foi realizada em CG/EM modelo CG-17A Marca Shimadzu, coluna BD5 a temperatura do injetor foi de 230°C e o detector de ionização de chama (FID) de 280 °C. Rampa de aquecimento foi uma isoterma de 250 °C. Hélio foi utilizado como gás de arraste, a uma pressão de 80 Kpa e velocidade linear de 1 mL/min. A identificação do pico foi baseada na comparação dos tempos de retenção obtidos e espectros de massas com as dos padrões.

Com o objetivo de se investigar as concentrações a serem trabalhadas na construção da curva de calibração, foi realizada uma pré-análise nos processos de extração. Desse modo foi possível obter as informações sobre a provável

concentração dos compostos químicos presentes no extrato, de modo que a concentração dos extratos ficasse dentro das concentrações da curva de calibração.

Para a análise da concentração dos extratos, foi preparada uma solução de cada processo de extração, sendo que a análise cromatográfica dos esteróides estigmasterol e β -sitosterol foi obtida, conforme demonstrado na tabela 6.

TABELA 6: ÁREA OBTIDA PARA OS ESTERÓIDES ESTIGMASTEROL E β -SITOSTEROL, PARA OS PROCESSOS DE EXTRAÇÃO PERCOLAÇÃO, AGITAÇÃO EM VORTEX E SONICAÇÃO.

| Processo de extração | Área Estigmasterol | Área β -Sitosterol |
|-------------------------|-----------------------|-----------------------------|
| Percolação | 3.812.411 | 3.757.217 |
| Agitação Vortex | 3.862.464 | 4.375.739 |
| Sonicação | 4.817.594 | 3.963.807 |

A quantificação foi estabelecida pela relação existente entre a área do pico, determinada por CG, com a concentração obtida mediante curva de calibração ($Y = A + Bx$).

4.6.5.1. Curva de calibração do estigmasterol:

A curva de calibração linear para o estigmasterol foi obtida através da área dos picos do estigmasterol (Y), versus a quantidade injetada (X mg/g) (tabela 7; figura 4). Os valores obtidos para A e B na curva de calibração foi de $(- 1,41388 \times 10^5)$ e $(1,73139 \times 10^8)$, respectivamente.

TABELA 7: RELAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO DO ESTIGMASTEROL E A ÁREA DO PICO:

| CONC (mg/g) | ÁREA DO PICO | TR |
|-------------|--------------|------|
| 0,02 | 3.417.767 | 13,4 |
| 0,03 | 4.860.050 | |
| 0,04 | 6.880.552 | |

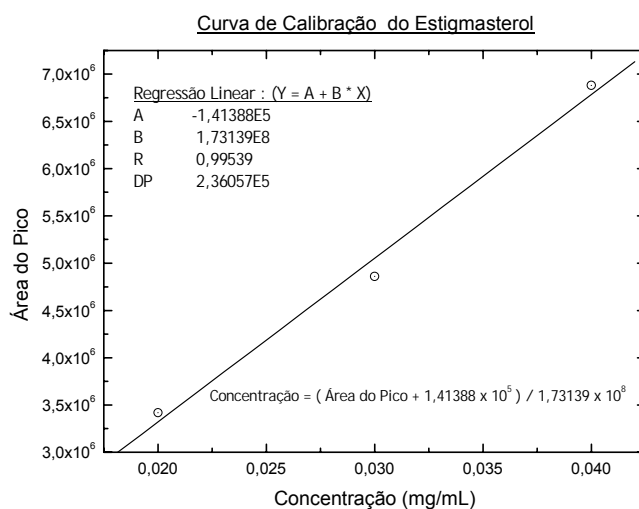


FIGURA 4: CURVA DE CALIBRAÇÃO OBTIDA PARA O ESTIGMASTEROL, ONDE (Y) É ÁREA DO PICO E (X) É CONCENTRAÇÃO EM mg/g.

4.6.5.2. Análise Quantitativa do β -Sitosterol:

A curva de calibração linear para o β -sitosterol também foi obtida através da área dos picos do β -sitosterol (Y), versus a quantidade injetada (X mg/g) (tabela 8; figura 5). Os valores obtidos para A e B na curva de calibração foram de $(1,39854 \times 10^5)$ e $(8,3262 \times 10^7)$, respectivamente.

TABELA 8: RELAÇÃO ENTRE A ÁREA DO PICO E A CONCENTRAÇÃO:

| CONC (mg/g) | ÁREA DO PICO | TR |
|-------------|--------------|------|
| 0,03 | 2.642.730 | |
| 0,04 | 3.460.314 | 14,7 |
| 0,05 | 4.307.972 | |

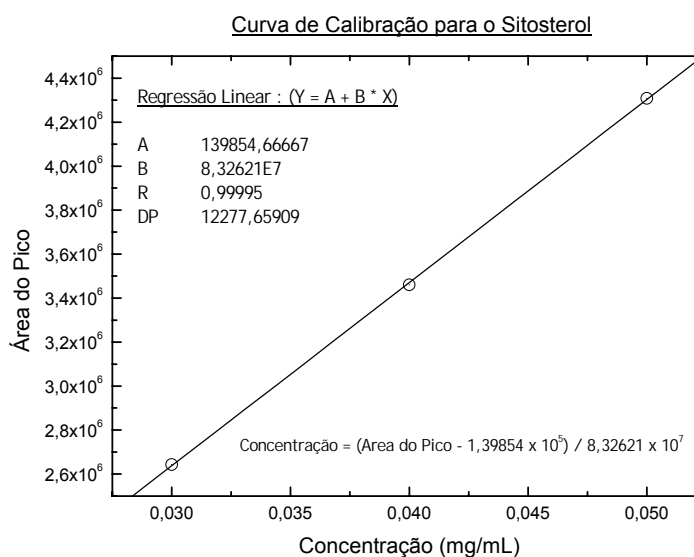


FIGURA 9: CURVA DE CALIBRAÇÃO OBTIDA PARA O β -SITOSTEROL, ONDE Y É ÁREA DO PICO E X É COCENTRAÇÃO EM mg/g.

4.7 AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE QUÍMICA PELO CONTROLE SAZONAL

O controle sazonal teve como finalidade a avaliação da variabilidade química dos metabólitos secundários de *C. officinalis*, nos meses do ano. A variabilidade química decorrente dos fatores sazonais nas flores de *C. officinalis* foi avaliada por meio cromatográfico em CLAE.

4.7.1 Análise do rendimento dos extratos brutos

Após a extração, o solvente remanescente foi evaporado e a massa do extrato determinada. Os resultados expressos pela média de duas determinações.

4.7.2 Investigação do potencial de sensibilidade frente aos processos de extração

Os três processos de extração foram investigados sobre possíveis alterações da atividade antibacteriana, decorrentes do processo utilizado na extração. Foram empregados microrganismos patogênicos gram positivo e negativo. A metodologia empregada foi cavidade placa.

4.7.3 Análise qualitativa do perfil cromatográfico por meio de CLAE

Para a análise do perfil cromatográfico em CLAE foi utilizada coluna cromatográfica RP-18 250x4 e a fase móvel foi composta por uma mistura de água (A) com pH ajustado para 3,0 com ácido ortofosfórico, acetonitrila (B) e metanol(C) (tabela 9), com gradiente de eluição. O fluxo foi de 1mL/min e o volume de injeção de 20µl. Foi realizada uma análise preliminar com o detector UV fixado em 215, 232, 274 e 430nm. Posteriormente para as análises, o detector foi fixado em 215 nm. Os extratos foram analisados na concentração de 1mg/mL dissolvidos em MeOH.

TABELA 9: SISTEMA DE ELUIÇÃO PARA ANÁLISE EM CLAE NO CONTROLE SAZONAL (DOZE MESES DO ANO).

| GRADIENTE | | | | GRADIENTE | | | |
|----------------|-----|----|----|----------------|----|---|-----|
| TEMPO (min) | A | B | C | TEMPO (min) | A | B | C |
| 0 | 100 | 0 | 0 | 20,0 | 40 | 9 | 51 |
| 1 | 100 | 0 | 0 | 25,0 | 35 | 7 | 58 |
| 5,1 | 80 | 18 | 2 | 30,0 | 30 | 7 | 63 |
| 7,0 | 77 | 16 | 7 | 35,0 | 20 | 5 | 75 |
| 8,5 | 74 | 13 | 13 | 40,0 | 10 | 3 | 87 |
| 10,0 | 70 | 10 | 20 | 42,0 | 2 | 1 | 97 |
| 13,0 | 60 | 10 | 30 | 50,0 | 0 | 0 | 100 |
| 15,0 | 50 | 10 | 40 | | | | |

(A) Água (pH 3,0), (B) Acetonitrila e (C) Metanol.

4.8 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TOXICOLÓGICO E MUTAGÊNICO

Foram utilizados ratos albinos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), machos e fêmeas (para os estudos de toxicologia) e apenas machos (para os estudos de mutagênese), com aproximadamente 60 dias de vida, fornecidos e confinados em espaço físico apropriado no Biotério do Setor de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG - PR, recebendo ração especial para animais de laboratório e água "*ad libitum*".

4.8.1 POTENCIAL TOXICOLÓGICO

Para o estudo toxicológico foi trabalhado com n=10, subdivididos em dois grupos: controle negativo (salina) e teste (extrato de Calêndula). A investigação foi avaliada para o extrato bruto segundo a metodologia descrita por BRITO (1994). O estudo iniciou se pela administração de 5g de extrato por Kg de rato. Foram selecionadas duas vias para administração: oral e intra-peritoneal (IP). Durante o

tratamento foi realizado o monitoramento do peso dos animais. Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente pelo teste “*t de students*”.

4.8.2 POTENCIAL MUTAGÊNICO

Para a investigação do potencial mutagênico foi adotado o teste do micronúcleo descrito originalmente por HEDDLE (1973) e modificado por SCHIMID (1975), em células de medula óssea, e posteriormente pelo teste de AMES (1971).

4.8.2.1 Teste do Micronúcleo

A pesquisa de micronúcleo foi realizada em células de medula óssea. Para esta investigação foram realizados ensaios agudo e sub-agudo (ou agudo com doses repetidas). Para o estudo foi trabalhado com n=5 subdivididos em três grupos: controle negativo (salina 10mL/Kg), teste (extrato de Calêndula 100mg/Kg) e controle positivo (mitomicina C[®] 1 mg/Kg). A administração foi realizada pelas vias oral e IP:

4.8.2.1.1 Ensaio Agudo

O sacrifício e retirada da medula ocorreram após 36 horas da administração, para os três grupos;

4.8.2.1.2 Ensaio Sub-agudo

Foi administrado o extrato de Calêndula (100mg/Kg) e salina (10 mL/Kg) durante 9 dias, com intervalo de 24 horas entre cada administração. O controle positivo foi administrado 36 horas antes do sacrifício. No estudo sub-agudo, a análise de micronúcleos foi ainda realizada no sangue periférico.

A análise estatística de ambos os testes foi realizada pelo teste ANOVA / Kruskal-Wallis.

4.8.2.2 Teste de Ames

O teste de Ames foi realizado, com a cepa TA 100 (*Salmonella typhimurium*), através da técnica de incorporação em placa de petri com pré-incubação de 30

minutos. O volume utilizado foi de 12,5; 25; 50; 75 e 100 μ L por placa, de extrato da *Calendula officinalis* suspenso em DMSO (5mg/mL). O teste foi realizado em triplicata e o controle positivo utilizado foi Azida Sódica (25 μ L). A análise estatística foi realizada pelo ANOVA.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análises Preliminares

Com o propósito de se estabelecer parâmetros de qualidade, foram realizadas análises macroscópicas, microscópicas e físicas preliminares com a planta em estudo.

5.1.1 Análises Macro e Microscópicas

As análises macro e microscópicas permitiram evidenciar estruturas celulares descritas na FARMACOPÉIA BRASILEIRA (2003) e que caracterizam a *C. officinalis*, como por exemplo, presença de cristais de oxalato de cálcio, região basal da face abaxial com tricomas tectores longos, multicelulares e bisseriados, células do parênquima subjacente da corola ligulada com numerosas gotas de óleo de coloração amarelo-alaranjada a amarelo-clara, grãos de pólen, aparelho reprodutor, entre outros.

5.1.2. Avaliação das características físicas do material vegetal:

As análises físicas que foram realizadas (densidade aparente, granulometria, teor de voláteis, teor de água e cinzas), confirmaram que a planta medicinal apresentava condições adequadas para o emprego na fitoterapia, pois estão de acordo com o que preconiza a Farmacopéia brasileira.

5.1.2.1 Densidade Aparente

A determinação da densidade aparente da *C. officinalis* apresentou como resultado médio das análises um valor de aproximadamente de 0,18 g/mL (tabela 10).

TABELA 10: DENSIDADE APARENTE da *C. officinalis* REALIZADA EM TRIPLICATA.

| DETERMINAÇÕES | PESO (g) | VOLUME (ml) | DENSIDADE (g/ml) |
|---------------|----------|-------------|------------------|
| 1 | 45,6 | 250 | 0,17 |
| 2 | 45,3 | 250 | 0,18 |
| 3 | 45,6 | 250 | 0,18 |
| Média | 45,5 | 250 | 0,18 |

5.1.2.2 Determinação Granulométrica

A avaliação granulométrica da *C. officinalis* (tabela 11), permitiu concluir que o material utilizado no experimento apresentava um pó moderadamente grosso, sendo este, definido pela FARMACOPÉIA BRASILEIRA (1988), como aquele cujas partículas passam em sua totalidade pelo tamis com abertura nominal de malha de 710 μm e, no máximo, 40% pelo tamis com abertura nominal de malha de 250 μm .

TABELA 11: DETERMINAÇÃO DA GRANULOMETRIA DA DROGA.

| Amostra = 50 g | TELA 0,50 mm | TELA 0,35 mm | TELA 0,25 mm | TELA 0,15 mm | FUNDO |
|------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------|
| Massa de planta / tela | 26,48 | 11,96 | 7,23 | 2,87 | 1,50 |
| % | 57,97 | 23,92 | 14,46 | 5,74 | 3,00 |

5.1.2.3 Determinação de Voláteis

A determinação de perdas por volatilização, realizada em duplicata nas temperaturas de 45 e 105°C, obteve como resultado um teor de 4,4 % e 11,9%, respectivamente (tabela 12).

TABELA 12: PERDA DA DROGA REALIZADA EM BALANÇA DE INFRAVERMELHO EM DOIS PATAMARES DE TEMPERATURA.

| TEMPERATURA (°C) | TOTAL (%) |
|------------------|-----------|
| 45 | 4,4 |
| 105 | 11,9 |

5.1.2.4 Determinação do Teor de Água

A determinação do teor de água, realizada em triplicata (tabela 13), apresentou como resultado médio um teor de 13,79%. O teor de água presente no material vegetal estava ligeiramente acima do teor de 12% recomendado pela FARMACOPÉIA BRASILEIRA (2003).

TABELA 13: DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁGUA NA DROGA POR KARL FISHER.

| DETERMINAÇÃO | % DE ÁGUA DA PLANTA ESTABILIZADA |
|--------------|-------------------------------------|
| 1 | 13,96 |
| 2 | 13,89 |
| 3 | 13,53 |
| Média | 13,79 |

5.1.2.5 Determinação do Teor de Cinzas

A avaliação do teor de cinzas, determinada em forno mufla, apresentou como resultado um teor de cinzas de aproximadamente de 8,33 % (tabela 14), estando este valor de acordo com a recomendação da FARMACOPÉIA BRASILEIRA de, no máximo, 10% de cinzas.

TABELA 14: DETERMINAÇÃO GRAVIMÉTRICA DA PERDA DA DROGA REALIZADA EM MUFLA COM CINCO PATAMARES DE TEMPERATURA.

| Temperaturas (°C) | Massa (g) (Média – 5 determ.) | % perdas |
|-------------------|----------------------------------|----------|
| 45 | 1,9350 | 4,22 |
| 105 | 1,8562 | 8,12 |
| 450 | 0,1802 | 91,08 |
| 675 | 0,1682 | 91,67 |

5.2 INVESTIGAÇÃO DO GRAU DE SENSIBILIDADE DOS EXTRATOS DE *C. officinalis* FRENTE A CEPAS PATOGÊNICAS

Para iniciar o estudo biomonitorado pela atividade antibacteriana, as sub-frações HEX, DCM, AcOEt, MeOH e EtOH 85% das flores de *C. officinalis* foram ensaiadas pela metodologia da cavidade em placa, com o intuito de avaliar o perfil de sensibilidade frente a microrganismos patogênicos, gram positivo (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*) e negativo (*Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*).

De um modo geral, a atividade antibacteriana observada permitiu concluir que, conforme mostra a tabela 15, para as espécies ensaiadas, os extratos foram na maioria ativos para as cepas gram positivas, sendo que apenas o extrato MeOH apresentou atividade para gram negativos (*K. pneumoniae*). As sub-frações MeOH e EtOH apresentaram atividade inibitória para *B. cereus* (gram positivo). Dentre as frações ensaiadas, as frações HEX e DCM apresentaram melhor desempenho na atividade antibacteriana para gram positivos (*B. cereus* e *S. aureus*).

Estes resultados provavelmente estão relacionados com as diferenças na composição química da membrana que existe entre os grupos de bactérias, como, estrutura, composição e permeabilidade da parede celular. As bactérias gram negativo contêm uma porcentagem mais alta de lipídeos (11-22%) que as bactérias gram positivo (1-4%). Observa-se que as bactérias gram positivo são mais

permeáveis que as bactérias gram negativo, permitindo a passagem dos compostos ao seu interior.

Com o objetivo de confirmar a ação antibacteriana das frações apolares para gram positivos, o estudo também foi realizado pela técnica do cilindro em placas, utilizando dois microrganismos (*S. aureus* e *M. luteus*), ambos gram positivo. Os resultados, apresentados na tabela 16, demonstraram uma sensibilidade mais expressiva dos microrganismos gram positivos, em relação à técnica da cavidade-placa. Observamos ainda que os resultados confirmam a atividade antibacteriana para as frações apolares (HEX e DCM).

TABELA 15: AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DAS FRAÇÕES DE *C. officinalis* (TECNICA CAVIDADE PLACA)

| microrganismos | Extratos (3,0mg/cavidade) | | | | | VC | Controles | |
|----------------------|---------------------------|------|-------|------|--------|----|-----------|----|
| | HEX | DCM | AcOEt | MeOH | EOH85% | | C1 | C2 |
| <i>S. aureus</i> | 12,0 | 10,0 | R | R | R | + | R | 18 |
| <i>B.cereus</i> | 11,0 | 10,5 | R | 9,5 | 10 | + | R | 21 |
| <i>E. aerogenes</i> | R | R | R | R | R | + | R | 20 |
| <i>K. pneumoniae</i> | R | R | R | 10 | R | + | R | 17 |
| <i>P. aeruginosa</i> | R | R | R | R | R | + | R | 18 |

R: Resistente; VC: viabilidade da cepa; C1: controle negativo (DMSO); C2: Controle positivo (Cloranfenicol).

Resultado expresso em mm.

TABELA 16: AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DAS FRAÇÕES DE *C. officinalis*, 20 mg/mL DE DMSO (TECNICA CILINDRO EM PLACAS):

| microrganismos | Extratos (150µl/cilindro) | | | | | VC | Controles | |
|------------------|---------------------------|------|-------|------|--------|----|-----------|----|
| | HEX | DCM | AcOEt | MeOH | EOH85% | | C1 | C2 |
| <i>S. aureus</i> | 19,5 | 17,0 | R | R | 8,0 | + | R | 31 |
| <i>M. luteus</i> | 11,0 | 13,0 | R | R | 8,0 | + | R | 29 |

R: Resistente; VC: viabilidade da cepa; C1: controle negativo (DMSO); C2: Controle positivo (Ampicilina).

Resultado expresso em mm.

Em continuidade ao estudo biomonitorado, a investigação concentrou-se no fracionamento cromatográfico por coluna filtrante das sub-frações HEX E DCM reunidas, utilizando em seqüência os solventes éter de petróleo (Ap-éter), diclorometano (Ap-DCM), acetato de etila (Ap-AcOEt) e metanol (Ap-MeOH), seguido de avaliação da sensibilidade dos microrganismos anteriormente testados. Os resultados obtidos, apresentados na tabela 17, sugeriram que o isolamento dos compostos responsáveis pela atividade antibacteriana poderia ser obtido a partir das sub-frações Ap-AcOEt e Ap-MeOH.

TABELA 17: AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DAS SUB-FRAÇÕES APOLARES DE *C. officinalis*

| microrganismos | Extratos 3 mg/cavidade | | | | VC | Controles | |
|----------------------|------------------------|--------|----------|---------|----|-----------|----|
| | Ap-ÉTER | Ap-DCM | Ap-AcOEt | Ap-MeOH | | C1 | C2 |
| <i>S. aureus</i> | R | R | 10,5 | R | + | R | 20 |
| <i>B. cereus</i> | R | R | 10,0 | 10,0 | + | R | 20 |
| <i>E. aerogenes</i> | R | R | R | R | + | R | 18 |
| <i>K. pneumoniae</i> | R | R | R | R | + | R | 19 |
| <i>P. aeruginosa</i> | R | R | R | R | + | R | 18 |

R: Resistente; VC: viabilidade da cepa; C1: controle negativo (DMSO); C2: Controle positivo (Cloranfenicol).

Resultado expresso em mm.

A análise espectroscópica das sub-frações AcOEt e MeOH revelou que as mesmas eram constituídas basicamente por compostos alifáticos, possivelmente esteróides e triterpenos.

5.3. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS ISOLADOS:

Na tentativa de isolar os metabólitos responsáveis pela atividade antibacteriana, presentes na fração apolar (hexânica e diclorometano) foram realizados diversos procedimentos cromatográficos.

A partir da fração Ap-AcOEt, foram isolados os compostos **2** (18 mg e 6 mg), **3** (6 mg), **5** (8 mg) e **6** (7 mg).

A partir da fração Ap-MeOH, foram isolados novamente o compostos **2** (8 mg), o composto **4** (12 mg) e o composto **1** (5 mg).

Os compostos isolados foram identificados por espectro de RMN de ^1H - e ^{13}C bem como por comparação com dados reportados na literatura, visto que todos os compostos isolados já haviam sido isolados anteriormente na espécie. Os triterpenos obtidos em mistura foram identificados segundo a metodologia descrita por OLEA e ROQUE (1990).

• Substância 1 – β -Sitosterol

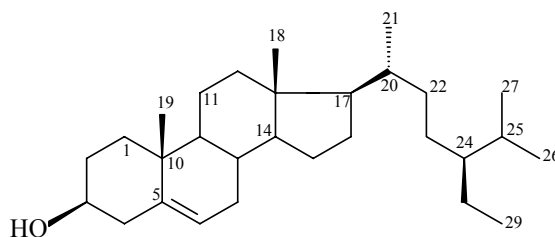


FIGURA 10: ESTRUTURA DA SUBSTÂNCIA 1

Os esteróides são biogeneticamente muito relacionados aos triterpenos com um esqueleto cíclico base igual ao dos triterpenóides tetracíclicos. Apresentam-se como sólidos incolores, cristalinos, opticamente ativos, de ponto de fusão ligeiramente inferior a 200°C.

O espectro de RMN de ^{13}C (fig 24, pág. 105), listados na tabela 18 mostrou a presença de 29 sinais de carbono. Dentre os quais, apenas dois deles, em δC 121,7 e 140,7, característicos de carbonos olefínicos, referentes à ligação dupla entre os carbonos 5 e 6 do esteróide (esqueleto lanostano). A identificação estrutural final do composto **1** foi realizada por comparação com dados encontrados na literatura (NES *et al.*, 1992) e posteriormente por espectrometria de massas. Este composto tratava-se do β -sitosterol, um esteróide comumente encontrado como metabólito secundário em plantas, inclusive nas angiospermas.

TABELA 18: DADOS DE δ OBTIDOS A PARTIR DE ESPECTRO DE RMN ^{13}C DO COMPOSTO **1** (β -SITOSTEROL) (CDCl_3 50MHZ):

| C | $\delta^{13}\text{C}$ (ppm) ¹ | $\delta^{13}\text{C}$ (ppm) ² | Multip. | C | $\delta^{13}\text{C}$ (ppm) ¹ | $\delta^{13}\text{C}$ (ppm) ² | Multip. |
|----|--|--|---------------|----|--|--|---------------|
| 1 | 37,2 | 37,2 | CH_2 | 16 | 56,0 | 29,6 | CH_2 |
| 2 | n/c | 33,9 | CH_2 | 17 | 11,9 | 56,0 | CH |
| 3 | 71,8 | 71,8 | CH | 18 | 19,4 | 11,9 | CH_3 |
| 4 | n/c | 42,3 | CH_2 | 19 | 36,1 | 19,4 | CH_3 |
| 5 | 140,0 | 140,7 | C | 20 | 18,8 | 36,1 | CH |
| 6 | 121,7 | 121,7 | CH | 21 | n/c | 18,8 | CH_3 |
| 7 | n/c | 31,8 | CH_2 | 22 | n/c | 29,13 | CH_2 |
| 8 | n/c | 31,6 | CH | 23 | 45,8 | n/c | CH_2 |
| 9 | 50,1 | 50,1 | CH | 24 | n/c | 45,8 | CH |
| 10 | 36,5 | 36,4 | C | 25 | 19,8 | n/c | CH |
| 11 | 21,1 | 21,0 | CH_2 | 26 | 19,1 | 19,8 | CH_3 |
| 12 | 39,7 | 39,7 | CH_2 | 27 | 23,0 | 19,0 | CH_3 |
| 13 | 42,3 | 45,8 | C | 28 | 12,0 | 23,0 | CH_2 |
| 14 | 56,7 | 56,7 | CH | 29 | 56,0 | 12,0 | CH_3 |
| 15 | n/c | 24,2 | CH_2 | | | | |

¹ – Dados da literatura para o β -Sitosterol, NES, 1992 (CDCl_3 , 50MHz)

² – RMN ^{13}C dados experimentais para o β -Sitosterol (CDCl_3 , 50 MHz)

• Substância 2 – Estigmasterol

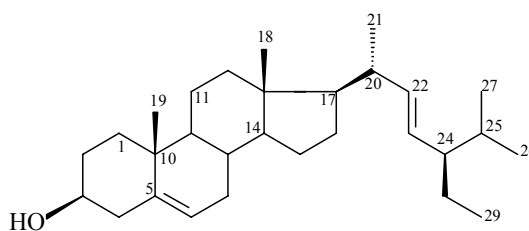


FIGURA 11: ESTRUTURA DA SUBSTÂNCIA 2

A identificação estrutural da substância **2** foi realizada através da comparação de seus espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C da substância isolada com os relatados na literatura (FORGO; KÖVÉR, 2004). Os espectros de RMN de ^1H dessa substância revelaram a presença de sinais característicos de esteróides, basicamente com a mesma apresentação do composto **1**.

Na análise do espectro de RMN de ^{13}C na região dos Csp^2 , onde foi possível observar a presença dos sinais em 140,7 e 121,7 ppm, relativos à dupla em

$\Delta^{5,6}$ de esteróides, além dos sinais em δ 138,3 e 129,2 relativos à dupla em $\Delta^{22,23}$. Os dados de RMN ^{13}C (fig. 25, pág. 105) estão demonstrados na tabela 19.

A identificação estrutural final do composto **2** foi realizada por comparação com dados encontrados na literatura (FORGO; KÖVÉR, 2004) e posteriormente por espectrometria de massas. Este composto tratava-se do Estigmasterol, também um esteróide comumente encontrado como metabólito secundário em plantas, juntamente com o β -Sitosterol.

TABELA 19: DADOS DE δ OBTIDOS A PARTIR DE ESPECTRO DE RMN ^{13}C DO COMPOSTO **2** (ESTIGMASTEROL) (CDCl_3 50MHZ):

| C | $\delta^{13}\text{C}$ (ppm) ¹ | $\delta^{13}\text{C}$ (ppm) ² | Multip | C | $\delta^{13}\text{C}$ (ppm) ¹ | $\delta^{13}\text{C}$ (ppm) ² | Multip. |
|----|--|--|---------------|----|--|--|---------------|
| 1 | 37,6 | 37,2 | CH_2 | 16 | 28,9 | 29,0 | CH_2 |
| 2 | 31,9 | 31,7 | CH_2 | 17 | 56,3 | 55,9 | CH |
| 3 | 72,0 | 71,8 | CH | 18 | 12,2 | 12,0 | CH_3 |
| 4 | 42,5 | 42,3 | CH_2 | 19 | 19,5 | 18,9 | CH_3 |
| 5 | 140,8 | 140,7 | C | 20 | 40,4 | 39,7 | CH |
| 6 | 121,8 | 121,7 | CH | 21 | 21,4 | 21,1 | CH_3 |
| 7 | 32,1 | 31,9 | CH_2 | 22 | 138,3 | 138,3 | CH |
| 8 | 32,2 | 31,9 | CH | 23 | 129,7 | 129,2 | CH |
| 9 | 50,5 | 50,1 | CH | 24 | 51,5 | 55,9 | CH |
| 10 | 36,5 | 36,5 | C | 25 | 32,2 | 31,9 | CH |
| 11 | 21,2 | 19,4 | CH_2 | 26 | 21,2 | 21,2 | CH_3 |
| 12 | 40,0 | 40,0 | CH_2 | 27 | 19,2 | 18,9 | CH_3 |
| 13 | 42,2 | 42,3 | C | 28 | 25,4 | 25,4 | CH_2 |
| 14 | 57,1 | 56,8 | CH | 29 | 12,2 | 12,2 | CH_3 |
| 15 | 25,4 | 25,4 | CH_2 | | | | |

¹ – Dados da literatura para o Estigmasterol, (FORGO; KÖVÉR, 2004)(CDCl_3 , 50MHz)

² – RMN ^{13}C dados experimentais para o β -Sitosterol (CDCl_3 , 50 MHz)

- Substância 3 – α - Amirina

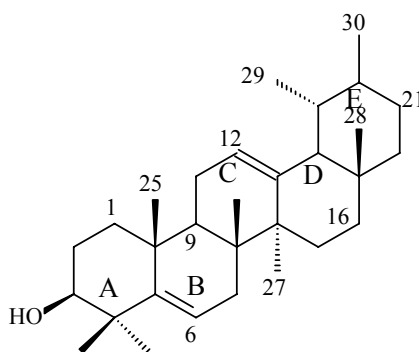


FIGURA 12: ESTRUTURA DA SUBSTÂNCIA 3

A partir da análise do espectro de RMN de ^{13}C , realizado para a substância **3**, foi possível observar na região dos Csp^2 , havia sinais referentes aos carbonos em 124,9,1 e 140,0ppm, podendo ser característica de triterpenos com esqueleto olean-12-eno (fig. 26, pág. 106). O triterpeno α -Amirina é um derivado do esqueleto ursano, com 5 anéis de 6 átomos e 2 metilas, nas posições 19 e 20 do anel “E”. Sua identificação foi realizada pela metodologia de OLEA e ROQUE (1990), comparando dados de ^{13}C com a literatura (MAHATO, 1994) (tabela 20).

TABELA 20: DADOS DE δ OBTIDOS A PARTIR DE ESPECTRO DE RMN ^{13}C DO COMPOSTO **3** (α -AMIRINA) (CDCl_3 50MHZ):

| C | $\delta^{13}\text{C}$ (ppm) ¹ | $\delta^{13}\text{C}$ (ppm) ² | Multip. | C | $\delta^{13}\text{C}$ (ppm) ¹ | $\delta^{13}\text{C}$ (ppm) ² | Multip. |
|----|--|--|-----------------|----|--|--|-----------------|
| 1 | 38.7 | 37,4 | CH ₂ | 16 | 26.6 | 26,6 | CH ₂ |
| 2 | 27.3 | 27,7 | CH ₂ | 17 | 33.7 | 34,2 | C |
| 3 | 79.0 | 79,5 | CH | 18 | 58.9 | 59,5 | CH |
| 4 | 38.8 | 38,7 | C | 19 | 39.6 | 39,3 | CH |
| 5 | 55.3 | 55,7 | CH | 20 | 39.6 | 39,3 | CH |
| 6 | 18.3 | 18,8 | CH ₂ | 21 | 31.2 | 31,7 | CH ₂ |
| 7 | 32.9 | 33,4 | CH ₂ | 22 | 41.5 | 40,1 | CH ₂ |
| 8 | 40.0 | 40,5 | C | 23 | 28.1 | 26,6 | CH ₃ |
| 9 | 47.7 | 48,2 | CH | 24 | 15.6 | 16,2 | CH ₃ |
| 10 | 37.9 | 36,5 | C | 25 | 15.6 | 16,1 | CH ₃ |
| 11 | 23.3 | 23,8 | CH ₂ | 26 | 16.8 | 17,3 | CH ₃ |
| 12 | 124.3 | 124,9 | CH | 27 | 23.3 | 23,7 | CH ₃ |
| 13 | 139.3 | 140,0 | C | 28 | 28.1 | 29,25 | CH ₃ |
| 14 | 42.0 | 42,0 | C | 29 | 17.4 | 17,9 | CH ₃ |
| 15 | 28.7 | 28,7 | CH ₂ | 30 | 21.3 | 22,0 | CH ₃ |

¹ – Dados da literatura para α -Amirina, MAHATO, 1994 (CDCl_3 , 50MHz)

² – RMN ^{13}C dados experimentais para a α -Amirina (CDCl_3 , 50 MHz)

• Substância 4 – Mistura de α e β - Amirina

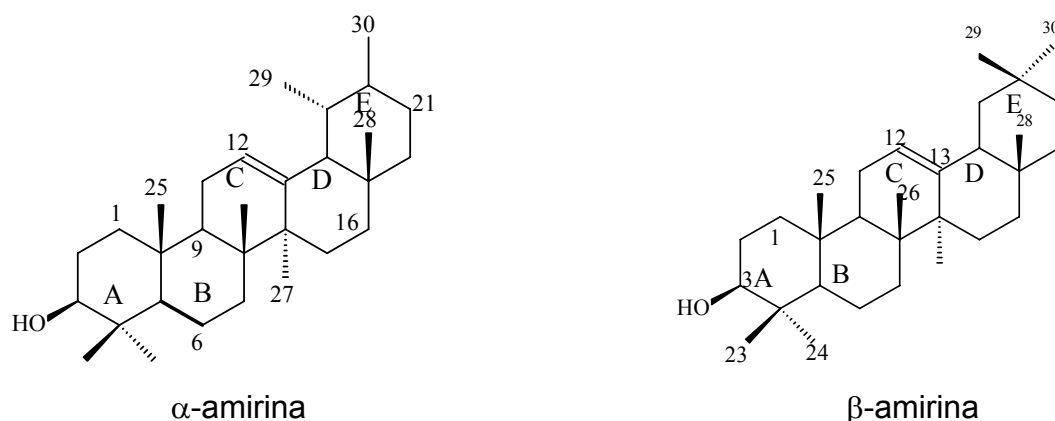


FIGURA 13: ESTRUTURA DA SUBSTÂNCIA 4

O Espectro de RMN de ^{13}C da fração **4** (fig. 27, pág. 106) apresentou uma grande quantidade de sinais, principalmente na região mais blindada do espectro (14 – 60 ppm), sendo que alguns deles com intensidades duplicadas, indicando que esta fração tratava-se muito possivelmente de uma mistura de triterpenos. Através dos deslocamentos químicos dos carbonos olefínicos foi possível identificarmos dois esqueletos de triterpenos presentes na mistura (tabela 21). Na região dos Csp^2 os sinais referentes aos quatro carbonos em 145,1 e 121,6 ppm e 139,5 e 124,3 ppm podem ser característicos de triterpenos com esqueleto olean-12-eno e urs-12-eno, respectivamente. Os dados de RMN de ^{13}C obtidos para a substância **4** são muito parecidos com aqueles obtidos para a α -Amirina, sugerindo que um dos compostos da mistura podia tratar-se do mesmo triterpenos isolado na substância **3**.

Partindo-se do pressuposto que se tratava de uma mistura de triterpenos desses esqueletos, o δ da mistura foi comparado com os valores de δ para α e β Amirina, justamente por serem isolados sempre juntos e pertencerem aos esqueletos acima citados. A identificação se baseou na metodologia descrita por OLEA e ROQUE (1990), usando dados de RMN de ^{13}C e comparação destes com dados descritos na literatura (MAHATO, 1994). As comparações desses dados corroboram que a fração **4** trata-se de uma mistura de α -Amirina e β -Amirina.

TABELA 21: DADOS DE δ OBTIDOS A PARTIR DE ESPECTRO DE RMN ^{13}C DO COMPOSTO 3 (α E β AMIRINA) (CDCl_3 50MHZ):

| C | $\delta^{13}\text{C}$ (ppm) ^{1A} | $\delta^{13}\text{C}$ (ppm) ^{2A} | Multip. | $\delta^{13}\text{C}$ (ppm) ^{1B} | $\delta^{13}\text{C}$ (ppm) ^{2B} | Multip. |
|----|---|---|-----------------|---|---|-----------------|
| 1 | 38.7 | 39,6 | CH ₂ | 38.7 | 39,6 | CH ₂ |
| 2 | 27.2 | 26,9 | CH ₂ | 27.3 | nc | CH ₂ |
| 3 | 78.8 | 79,1 | CH | 79.0 | 79,1 | CH |
| 4 | 38.7 | 47,2 | C | 38.8 | nc | C |
| 5 | 55.2 | 55,2 | CH | 55.3 | 55,2 | CH |
| 6 | 18.3 | 19,1 | CH ₂ | 18.5 | 19,1 | CH ₂ |
| 7 | 32.9 | 32,4 | CH ₂ | 32.8 | 32,5 | CH ₂ |
| 8 | 40.0 | 39,9 | C | 38.8 | 39,6 | C |
| 9 | 47.7 | 47,7 | CH | 47.7 | 47,2 | CH |
| 10 | 36.9 | 36,9 | C | 37.6 | 37,1 | C |
| 11 | 23.3 | 23,2 | CH ₂ | 23.6 | 23,3 | CH ₂ |
| 12 | 124.3 | 124,4 | CH | 121.8 | 121,7 | CH |
| 13 | 139.3 | 139,6 | C | 145.1 | 145,2 | C |
| 14 | 42.0 | 42,0 | C | 41.8 | 41,5 | C |
| 15 | 28.7 | 28,1 | CH ₂ | 26.2 | 26,1 | CH ₂ |
| 16 | 26.6 | 26,6 | CH ₂ | 27.0 | 27,2 | CH ₂ |
| 17 | 33.7 | 33,7 | C | 32.5 | 32,6 | C |
| 18 | 58.9 | 59,0 | CH | 47.4 | 47,6 | CH |
| 19 | 39.6 | 39,7 | CH | 46.9 | 46,8 | CH ₂ |
| 20 | 39.6 | 39,8 | CH | 31.1 | 31,2 | C |
| 21 | 31.2 | 31,1 | CH ₂ | 34.8 | 34,7 | CH ₂ |
| 22 | 41.5 | 41,5 | CH ₂ | 37.2 | 36,9 | CH ₂ |
| 23 | 28.1 | 28,1 | CH ₃ | 28.2 | 28,1 | CH ₃ |
| 24 | 15.6 | 15,7 | CH ₃ | 15.5 | 15,6 | CH ₃ |
| 25 | 15.6 | 15,6 | CH ₃ | 15.6 | 15,6 | CH ₃ |
| 26 | 16.8 | 16,8 | CH ₃ | 16.9 | 16,8 | CH ₃ |
| 27 | 23.3 | 23,3 | CH ₃ | 26.0 | 25,9 | CH ₃ |
| 28 | 28.1 | 28,7 | CH ₃ | 28.4 | 28,1 | CH ₃ |
| 29 | 17.4 | 17,4 | CH ₃ | 33.3 | 33,3 | CH ₃ |
| 30 | 21.3 | 21,4 | CH ₃ | 23.7 | 23,5 | CH ₃ |

^{1A} – Dados da literatura para α -Amirina, MAHATO, 1994 (CDCl_3 , 50 MHz)

^{2A} – RMN ^{13}C dados experimentais para a α -Amirina (CDCl_3 , 50 MHz)

^{1B} – Dados da literatura para β -Amirina, MAHATO, 1994 (CDCl_3 , 50 MHz)

^{2B} – RMN ^{13}C dados experimentais para a β -Amirina (CDCl_3 , 50 MHz)

nc – Não consta

• Substância 5 – Palmitato de Faradioila

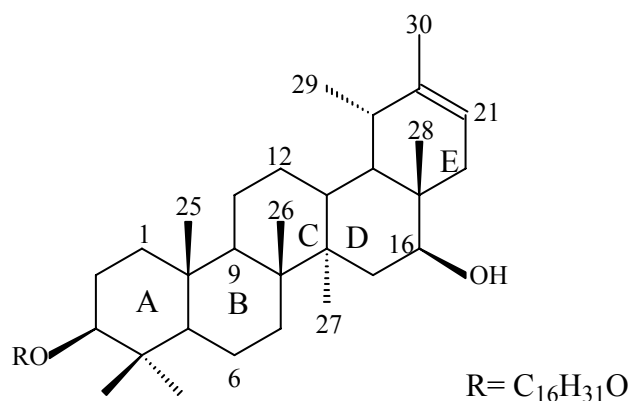


FIGURA 14: ESTRUTURA DA SUBSTÂNCIA 5

A identificação da substância **5** foi realizada com base nos espectros de RMN de 1H e de ^{13}C . Destes, o primeiro forneceu poucas informações quanto a sua estrutura, indicando apenas a presença de ácidos graxos, evidenciada pela presença de um sinal intenso em δ 1,2 além de pelo menos mais um composto de natureza triterpênica, evidenciado pelo número grande de sinais em δ próximo a 1,0 ppm, referentes aos grupos metílicos.

Em uma primeira análise parecia tratar-se de um triterpeno impurificado por ácidos graxos. Porém em CCD analítica, realizados em vários sistemas de solventes diferentes, o comportamento da fração era de uma substância pura.

O espectro de RMN de ^{13}C (fig. 28, pág. 107) da amostra apresentou 40 sinais, sendo que alguns deles com intensidade duplicada. Na região dos Csp^2 os sinais em 139,4 e 118,7 ppm, característicos de triterpenos com esqueleto urs-20-eno. O sinal em 173,6 ppm foi atribuído ao carbono carbonílico do éster do ácido graxo. A comparação dos δ dos carbonos próximos ao carbono C-3, com valores da literatura para o faradiol (ZITTERL-EGLEER, 1997) mostraram que C-2 estava protegido ($\Delta\delta$ 5,0 ppm) enquanto que o carbono oxi-metínico C-3 apresentava discreto efeito de desproteção. Os dados acima citados, aliados ao fato de que quando submetidos à CC em coluna apolar, nenhum composto era observado. Os dados apresentados permitiram concluir que o composto tratava-se então de um éster de triterpeno e não de uma mistura de substâncias como anteriormente sugerido. Por comparação com valores da literatura, o composto foi identificado então como o éster palmítico do Faradiol (ZITTERL-EGLEER, 1997), já

anteriormente isolado de calendula. Os dados de RMN ^{13}C estão demonstrados na tabela 22.

TABELA 22: DADOS DE δ OBTIDOS A PARTIR DE ESPECTRO DE RMN ^{13}C DO COMPOSTO PALMITATO DE FARADIOILA (CDCl_3 50MHZ):

| C | $\delta^{13}\text{C}$ (ppm) ¹ | $\delta^{13}\text{C}$ (ppm) ² | Multip. | C | $\delta^{13}\text{C}$ (ppm) ¹ | $\delta^{13}\text{C}$ (ppm) ² | Multip. |
|----|--|--|---------------|----|--|--|---------------|
| 1 | 38,5 | 38,4 | CH_2 | 16 | 76,2 | 76,3 | CH |
| 2 | 27,2 | 27,2 | CH_2 | 17 | 39,9 | 39,8 | C |
| 3 | 80,5 | 80,5 | CH | 18 | 47,6 | 47,5 | CH |
| 4 | 37,8 | 37,8 | C | 19 | 35,9 | 35,8 | CH |
| 5 | 55,4 | 55,3 | CH | 20 | 139,6 | 139,7 | C |
| 6 | 18,2 | 18,1 | CH_2 | 21 | 118,3 | 118,7 | CH |
| 7 | 34,2 | 34,1 | CH_2 | 22 | 36,6 | 36,5 | CH_2 |
| 8 | 41,1 | 41,0 | C | 23 | 28,0 | 27,9 | CH_3 |
| 9 | 49,9 | 49,8 | CH | 24 | 14,1 | 14,1 | CH_3 |
| 10 | 37,6 | 37,8 | C | 25 | 16,3 | 16,3 | CH_3 |
| 11 | 22,7 | 22,6 | CH_2 | 26 | 16,0 | 16,0 | CH_3 |
| 12 | 29,2 | 29,6 | CH_2 | 27 | 16,5 | 16,5 | CH_3 |
| 13 | 38,8 | 38,7 | C | 28 | 11,6 | 11,5 | CH_3 |
| 14 | 42,5 | 42,4 | C | 29 | 24,2 | 22,6 | CH_3 |
| 15 | 37,0 | 36,9 | CH_2 | 30 | 21,5 | 21,5 | CH_3 |

*ÁCIDO PALMÍTICO: 173,6; 34,8; 29,6; 29,4; 29,3; 29,2; 29,1; 25,1; 23,7; 16,3.

1 – Dados da literatura para Palmitato de Faradioila, ZITTERL-EGLSEER, 1997 (CDCl_3 , 50 MHz)

2 – RMN ^{13}C dados experimentais para a Palmitato de Faradioila (CDCl_3 , 50 MHz)

• Substância 6 – Lupeol

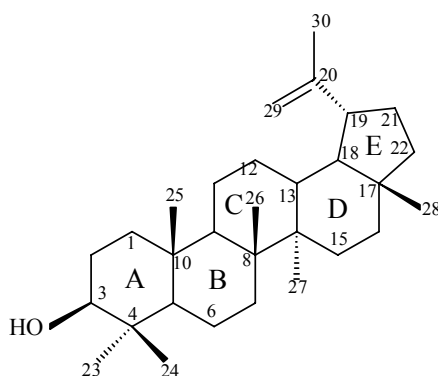


FIGURA 15: ESTRUTURA DA SUBSTÂNCIA 6

A substância isolada **6**, identificado como sendo o triterpeno Lupeol (fig. 29, pág. 107), também baseada na metodologia proposta por OLEA e ROQUE (1990),

usando dados de RMN de ^{13}C e comparação destes com valores descritos na literatura (NES, 1992).

O Lupeol é um triterpeno do esqueleto lupano, e possui uma estrutura pentacíclica no anel “E” composto por 5 membros. O Espectro de RMN de ^{13}C da fração E apresentou sinais na região dos Csp^2 referentes à dupla exocíclica em 151,0 e 109,3 ppm, sendo estas características de triterpenos com esqueleto lup-20(29)-eno (NES, 1992). A presença da dupla exocíclica é perfeitamente observável em RMN de ^1H , os dois hidrogênios H-29 absorvem na região de 4,6 ppm, como dois singletos largos visto que a constante de acoplamento entre eles é bastante pequena, da ordem de 1 Hz. Os dados de RMN ^{13}C estão demonstrados na tabela 23 foram extraídos de RMN de ^{13}C .

TABELA 23: DADOS DE δ OBTIDOS A PARTIR DE ESPECTRO DE RMN ^{13}C DA SUBSTÂNCIA 6 (LUPEOL) (CDCl_3 50MHZ):

| C | $\delta^{13}\text{C}$ (ppm) ¹ | $\delta^{13}\text{C}$ (ppm) ² | Multip. | C | $\delta^{13}\text{C}$ (ppm) ¹ | $\delta^{13}\text{C}$ (ppm) ² | Multip. |
|----|--|--|---------------|----|--|--|---------------|
| 1 | 38,7 | 38,69 | CH_2 | 16 | 35,6 | 35,57 | CH_2 |
| 2 | 27,4 | 27,4 | CH_2 | 17 | 43,0 | 42,99 | C |
| 3 | 78,9 | 79,0 | CH | 18 | 48,3 | 48,29 | CH |
| 4 | 38,8 | 38,84 | C | 19 | 47,9 | 47,98 | CH |
| 5 | 55,3 | 55,28 | CH | 20 | 150,9 | 150,98 | C |
| 6 | 18,3 | 18,31 | CH_2 | 21 | 29,8 | 29,69 | CH_2 |
| 7 | 34,2 | 34,26 | CH_2 | 22 | 40,0 | 39,98 | CH_2 |
| 8 | 40,8 | 39,98 | C | 23 | 28,0 | 29,83 | CH_3 |
| 9 | 50,4 | 50,42 | CH | 24 | 15,4 | 15,35 | CH_3 |
| 10 | 37,1 | 37,16 | C | 25 | 16,1 | 16,11 | CH_3 |
| 11 | 28,8 | n/c | CH_2 | 26 | 15,9 | 15,96 | CH_3 |
| 12 | 25,2 | 25,13 | CH_2 | 27 | 14,5 | 14,54 | CH_3 |
| 13 | 38,0 | 38,03 | CH | 28 | 18,0 | 17,99 | CH_3 |
| 14 | 42,8 | 42,82 | C | 29 | 109,3 | 109,3 | CH_2 |
| 15 | 27,4 | 27,4 | CH_2 | 30 | 19,3 | 19,28 | CH_3 |

¹ – Dados da literatura para o Lupeol, NES, 1992 (CDCl_3 , 50 MHz)

² – RMN ^{13}C dados experimentais para o Lupeol (CDCl_3 , 50 MHz)

Foram isoladas até o momento, 4 substâncias da subfração hexânica/acetato de etila e 3 da subfração hexânica/metanólica dos extratos Hexano/DCM de flores de *C. officinalis*. O estudo fitoquímico de *C. officinalis* permitiu o isolamento dos esteróides β -sitosterol (1) e estigmasterol (2) além dos triterpenos α -amirina (3), mistura dos triterpenos α e β -amirina (4), palmitato de faradióila (5) e o lupeol (6). Os

demais compostos que foram isolados até o momento, encontram-se ainda em fase de identificação e em pequena quantidade, não fazendo parte desta discussão.

5.4 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SENSIBILIDADE PARA AS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS E IDENTIFICADAS

Para o controle analítico quantitativo foi determinado o perfil de sensibilidade para os compostos isolados bem como a concentração inibitória mínima (MIC). Os compostos Estigmasterol, α -Amirina, α/β -Amirina e Palmitato de faradiola não apresentaram atividade antibacteriana na concentração inicial de 1000 $\mu\text{g} / \text{mL}$. O triterpeno Lupeol apresentou uma concentração inibitória mínima de $\geq 750 \mu\text{g/mL}$ para *B. cereus*, e $\geq 500 \mu\text{g/mL}$ para *M. luteus*, sendo que para os demais microrganismos não apresentou inibição na concentração inicial de 1000 $\mu\text{g} / \text{mL}$. O composto β -Sitosterol apresentou uma concentração inibitória mínima de $\geq 500 \mu\text{g/mL}$ para *B. cereus* e *S. aureus* e de $\geq 250 \mu\text{g/mL}$ para *M. luteus* (tabela 24).

Embora o perfil de sensibilidade apresentado para a fração apolar do extrato de Calendula tenha se mostrado satisfatório, a maioria dos compostos isolados do seu extrato mostraram uma baixa atividade antibacteriana. Este fato pode ser resultado de efeitos sinérgicos, antagônicos, além de outros fatores interativos entre diversos componentes, uma vez que a atividade antimicrobiana de extratos vegetais depende, não apenas da presença de substâncias antimicrobianas, mas também, das fases de desenvolvimento da planta e das condições de extração das mesmas.

TABELA 24: ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS COMPOSTOS ISOLADOS DE *Calendula officinalis* EXPRESSADOS EM MIC ($\mu\text{g/mL}$).

| COMPOSTOS | MIC ($\mu\text{g} / \text{mL}$) | | | | | |
|----------------------------|-----------------------------------|------------------|------------------|--------------------------------|----------------------|----------------------|
| | Microrganismos (gram positivo) | | | Microrganismos (gram negativo) | | |
| | <i>B. cereus</i> | <i>S. aureus</i> | <i>M. luteus</i> | <i>E. aerogenes</i> | <i>K. pneumoniae</i> | <i>P. aeruginosa</i> |
| Estigmasterol | > 1000 | > 1000 | > 1000 | > 1000 | > 1000 | > 1000 |
| β -Sitosterol | ≥ 500 | ≥ 500 | ≥ 250 | > 1000 | > 1000 | > 1000 |
| Lupeol | ≥ 750 | ≥ 1000 | ≥ 500 | > 1000 | > 1000 | > 1000 |
| α / β - Amirina | > 1000 | > 1000 | > 1000 | > 1000 | > 1000 | > 1000 |
| α - Amirina | > 1000 | > 1000 | > 1000 | > 1000 | > 1000 | > 1000 |
| Palmitato de Farodiola | > 1000 | > 1000 | > 1000 | > 1000 | > 1000 | > 1000 |

Os resultados da atividade antibacteriana apontaram até o momento para uma ação frente a microrganismos gram positivos. Os microrganismos que foram

utilizados neste estudo são provenientes de laboratórios de referência, não estiveram em contato com agentes antibacteriano e, portanto não adquiriram qualquer tipo de resistência aos mesmos. Com o propósito de avaliar o comportamento antibacteriano da *C. officinalis* frente a microrganismos patogênicos multirresistentes, foram selecionadas 32 estirpes de *Staphylococcus aureus* (identificadas de 1 a 32), coletadas de pacientes que apresentaram lesões de pele associadas à infecção. Este estudo possui um interesse particular, pois as cepas que já estiveram em contato com algum tipo de antimicrobiano adquirem formas diferentes de resistências à ação dos antibióticos.

Os resultados obtidos (tabela 25) demonstraram que, embora a atividade antibacteriana da *C. officinalis* para a cepa padrão fosse significativa, este resultado não se reproduziu para as cepas multirresistentes, apresentando baixo desempenho como antimicrobiano, tanto o extrato bruto como a fração ativa.

Pudemos observar que as cepas com maior sensibilidade para o extrato bruto e fração apolar de *C. officinalis* (cepas 13, 17 e 23), também apresentaram sensibilidade para os antimicrobianos Penicilina e Ampicilina.

Observou-se ainda que a fração apolar da planta apresentou uma atividade antibacteriana ligeiramente superior (diâmetros médios 11,030 mm) ao extrato bruto (diâmetros médios 10,121 mm). Estudos estatísticos (teste t) comparando os diâmetros obtidos com os dois extratos da *Calendula officinalis*, no entanto, mostraram que a ação antimicrobiana não era significativa ($P > 0,5$).

TABELA 25: PERFIL DE SENSIBILIDADE DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÃO APOLAR ATIVA DE *C. officinalis* FRENTE A CEPAS PADRÃO E MULTIRRESISTENTE DE *Staphylococcus aureus* (MÉTODO CILINDRO-PLACA)

| CEPA | EXTRATO BRUTO (halo mm) | FRAÇÃO HEX/DCM (halo mm) | Antibióticos | | CEPA | EXTRATO BRUTO (halo mm) | FRAÇÃO HEX/DCM (halo mm) | Antibióticos | |
|-------|-------------------------|--------------------------|--------------|-----------|------|-------------------------|--------------------------|--------------|-----------|
| | | | AMP (≥29) | PEN (≥29) | | | | AMP (≥29) | PEN (≥29) |
| ATCC* | 21 | 26 | 31 | 32 | 16 | 11 | 12 | 20 | 28 |
| 1 | 08 | 08 | R | R | 17* | 16 | 21 | 40 | 40 |
| 2 | 08 | 08 | 17 | 14 | 18 | 10 | 10 | 18 | 24 |
| 3 | 08 | 08 | 19 | 18 | 19 | 08 | 11 | 18 | 24 |
| 4 | 09 | 12 | 12 | 10 | 20 | 10 | 08 | 25 | 23 |
| 5 | 08 | 08 | 16 | 15 | 21 | 08 | 10 | 13 | 15 |
| 6 | 10 | 10 | 18 | 17 | 22 | 10 | 09 | R | R |
| 7 | 08 | 09 | 17 | 14 | 23* | 18 | 18 | 34 | 40 |
| 8 | 08 | 08 | 18 | 15 | 24 | 08 | 08 | 17 | 17 |
| 9 | 08 | 08 | 18 | 14 | 25 | 12 | 12 | 17 | 18 |
| 10 | 09 | 09 | 16 | 12 | 26 | 10 | 12 | 11 | R |
| 11 | 10 | 15 | R | R | 27 | 08 | 08 | 12 | R |
| 12 | 08 | 10 | 19 | 14 | 28 | 12 | 08 | 20 | 21 |
| 13* | 20 | 24 | 36 | 29 | 29 | 08 | 08 | 11 | R |
| 14 | 08 | 08 | 23 | 21 | 30 | 08 | 08 | R | R |
| 15 | 10 | 13 | 26 | 23 | 31 | 08 | 09 | 17 | 16 |
| | | | | | 32 | 08 | 08 | 20 | 18 |

*Cepas sensíveis para Ampicilina e Penicilina.

5.5 COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS EXTRATIVAS

Na busca de dados disponíveis na literatura a respeito de processos de extração, sob o ponto de vista qualitativo e quantitativo, não foi encontrada nenhuma informação que subsidiasse qual metodologia seria mais recomendada como processo de extração de *C. officinalis*. Como este parâmetro é extremamente importante para a realização de nosso estudo, realizamos uma análise comparativa entre três diferentes processos de extração (percolação, agitação em vortex e sonicação), com relação ao perfil cromatográfico em CLAE bem como do teor de sólidos totais, de modo que pudessem exercer alguma influência sobre a atividade antibacteriana testada.

5.5.1 Análise do rendimento do extrato bruto

Do ponto de vista quantitativo, a massa dos extratos obtidos, a partir de 1 g de planta, ficou aproximadamente em 10% da massa total do vegetal (tabela 26). O maior valor de rendimento foi observado para o processo de extração com agitação em vortex. A diferença de rendimento entre os processos de extração difere em

torno de 1%, de modo que a maior diferença de rendimento ficou entre o processo de percolação e agitação (com cerca de 2%).

TABELA 26: AVALIAÇÃO DAS PORCENTAGENS DE RENDIMENTO DOS PROCESSOS DE EXTRAÇÃO:

| Processo | Massa obtida | % rendimento |
|--------------------|--------------|--------------|
| Percolação | 92 mg | 9,2% |
| Agitação em Vortex | 110 mg | 11,0% |
| Sonicação | 104 mg | 10,4% |

5.5.2 Análise da atividade antibacteriana

Foram selecionados microrganismos gram positivo e negativo para avaliação do potencial da atividade antibacteriana dos extratos obtidos por percolação, agitação em vortex e sonicação. O perfil de sensibilidade apresentado para os microrganismos testados (tabela 27) revelou que a atividade antibacteriana apresentada para os três extratos testados se mostrou relativamente constante, de modo que, qualquer que seja o processo de extração escolhido, o nível de sensibilidade é o mesmo.

TABELA 27: AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DAS FRAÇÕES DE *C. officinalis* (TECNICA CAVIDADE PLACA).

| microrganismos | Extratos (3,0 mg/cavidade) | | | VC | Controles | |
|----------------------|----------------------------|-----------------|-----------|----|-----------|----|
| | PERCOLAÇÃO | AGITAÇÃO VORTEX | SONICAÇÃO | | C1 | C2 |
| <i>S. aureus</i> | 13,0 | 13,2 | 12,5 | + | R | 20 |
| <i>B. cereus</i> | 14,0 | 15,0 | 13,5 | + | R | 19 |
| <i>E. aerogenes</i> | R | R | R | + | R | 21 |
| <i>K. pneumoniae</i> | R | R | R | + | R | 20 |
| <i>P. aeruginosa</i> | R | R | R | + | R | 21 |

VC: viabilidade da cepa; R: Resistente; C1: controle negativo (DMSO); C2: Controle positivo (Cloranfenicol).

Resultado expresso em mm.

5.5.3. Análise Cromatográfica em CLAE:

A análise cromatográfica realizada em CLAE foi desenvolvida com finalidade de monitorar possíveis alterações no perfil cromatográfico decorrentes do processo de extração do material vegetal. Para tanto se procedeu com escolha do λ a ser utilizado no detector do equipamento CLAE, através da análise do espectro de

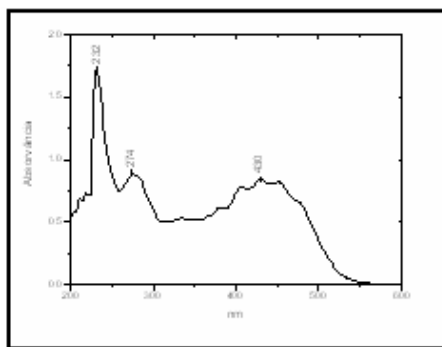
UV da fração apolar (hexânica/DCM) que apresentou bandas de absorção 215, 232, 274, e 430 nm (figura 6).

Os cromatogramas, realizados dentro das mesmas condições cromatográficas, permitiu a visualização do perfil químico do extrato. Pôde-se observar que o cromatograma realizado com λ em 215 nm (1) apresentou o maior número de picos, pois detectam nesse comprimento de onda também os triterpenos e esteroides (figura 6).

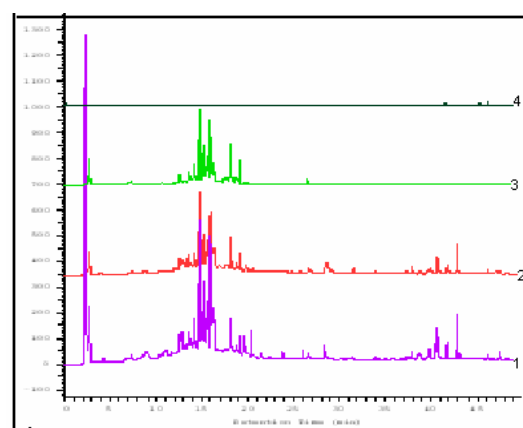
Observa-se ainda que conforme o aumento do valor de λ no detector, nas análises com $\lambda = 232\text{nm}$ (2) e com $\lambda = 274\text{nm}$ (3), foi possível observar uma sensível diminuição na visualização dos compostos mais apolares presentes no extrato. Contudo, foi possível observar também que no cromatograma obtido com $\lambda = 274\text{ nm}$ (3), só compostos mais polares do extrato (p. ex. flavonóides) puderam ser observados, podendo em casos mais específicos, ser utilizado para as análises exclusivas para essa classe de compostos. A análise realizada com $\lambda = 430\text{ nm}$ (4) não privilegiou nenhuma classe de compostos.

Dentro do aspecto qualitativo, foi realizada uma investigação cromatográfica em CLAE com o objetivo de verificar possíveis variações do perfil cromatográfico nos extratos obtidos.

Os cromatogramas foram comparados (figura 7), sendo que não foram observadas mudanças significativas. Quanto ao perfil dos compostos químicos na região de 30 a 40 min, observa-se que o processo de extração obtido por sonicação foi ligeiramente superior ao da agitação, principalmente para o composto com tr 37 minutos. De acordo com o resultado da atividade antibacteriana, esta diferença parece não interferir, pois o extrato da agitação apresentou um desempenho antibacteriano ligeiramente superior. As figuras estão apresentadas individualmente nos anexos, (fig. 30 - 32, pág. 108-9).

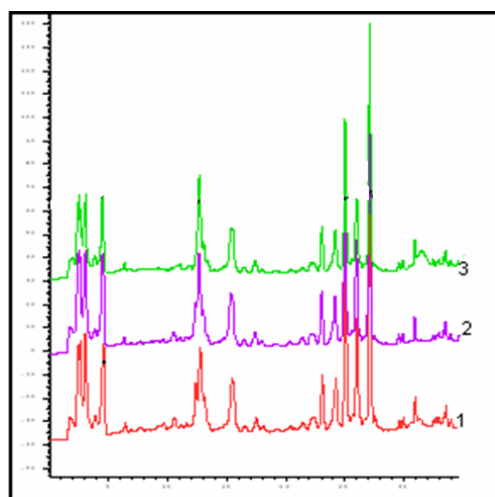


(A) Absorbância em espectrofotômetro UV



(B) Absorbância em CLAE do extrato bruto em λ 215 (1), 232 (2), 274 (3) e 430 (4)

FIGURA 16: AVALIAÇÃO DA ABSORTIVIDADE DA TINTURA FRENTE EM ESPECTROFOTÔMETRO (A) E ATRAVÉS DE CLAE NOS COMPRIMENTOS DE ONDA (λ) EM 215NM (1); 232NM (2); 274NM (3) E 430NM (4) (B). (CLAE: EIXO Y= ABSORBÂNCIA/EIXO X=TEMPO DE RETENÇÃO)



1- Percolação; 2- Agitação; 3- Sonicação.

FIGURA 17: ESTUDO COMPARATIVO DO PERFIL CROMATOGRAFICO POR CLAE ENTRE OS PROCESSOS DE EXTRAÇÃO (EIXO Y= ABSORBÂNCIA / EIXO X= TEMPO DE RETENÇÃO)

5.5.4. Análise Quantitativa dos Compostos Isolados por Meio de CG-EM:

Para a análise quantitativa dos compostos isolados e identificados, foi eleita, num primeiro momento, a metodologia por meio de CLAE. As análises foram realizadas variando-se o comprimento de onda de λ 195 a 215 nm, porém, devido a baixa absorvidade das substâncias testadas, a reprodutibilidade das análises ficou bastante comprometida. Como o objetivo era priorizar uma técnica rápida de análise, e que pudesse ser utilizada na rotina analítica, a opção se fez pela análise em CG-EM, posto que esta se mostrou eficiente na separação dos compostos e reposta do detector.

Os extratos obtidos pelos processos de percolação, agitação em vortex e sonicação foram analisados sob as mesmas condições e estão demonstrados nas figuras 8, 9 e 10, respectivamente.

Dentre as substâncias que foram isoladas, os esteróides Estigmasterol (figura 11) e β -Sitosterol (figura 12) apresentaram as melhores condições de análise, pois os picos no cromatograma ficaram melhor separados. Os triterpenos Lupeol e α -Amirina tiveram tempos de retenção muito próximos, sendo de 17,6 minutos para α -Amirina e 17,9 para lupeol, não sendo possível a quantificação nas mesmas condições de análise.

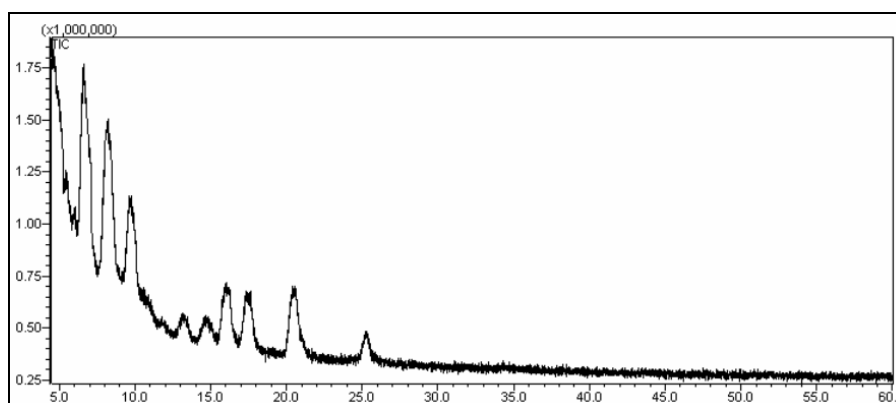


FIGURA 18: CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG DO EXTRATO OBTIDO POR PERCOLAÇÃO.

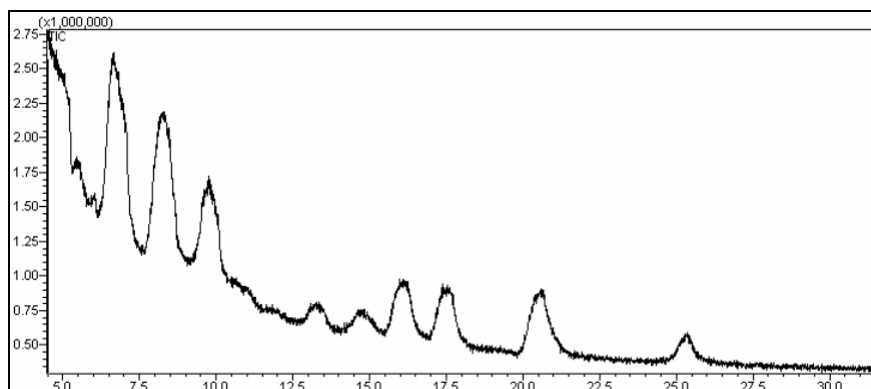


FIGURA 19: CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG DO EXTRATO OBTIDO POR AGITAÇÃO EM VORTEX

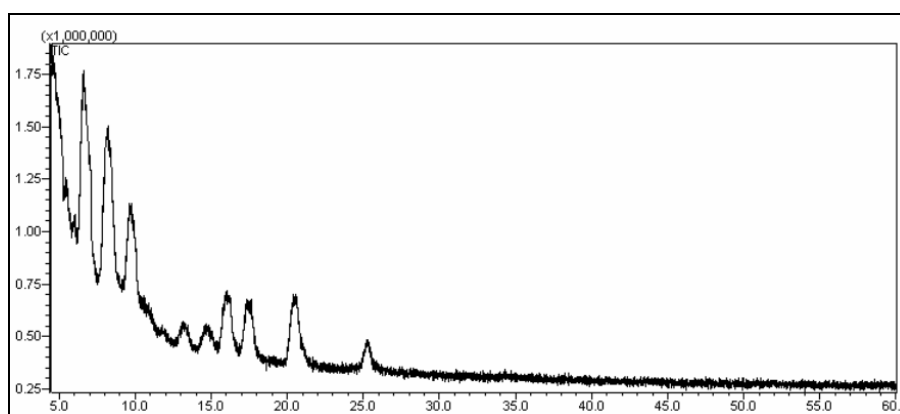


FIGURA20: CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG DO EXTRATO OBTIDO POR AGITAÇÃO POR SONICAÇÃO

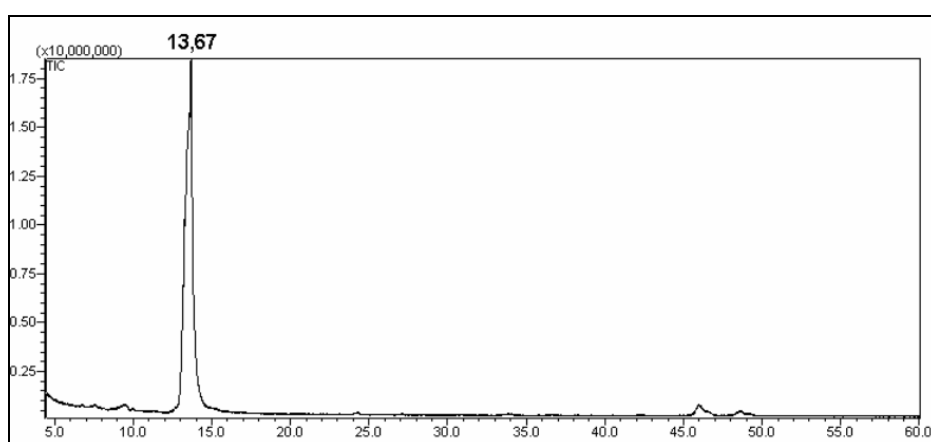


FIGURA 21: CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG DO COMPOSTO ESTIGMASTEROL

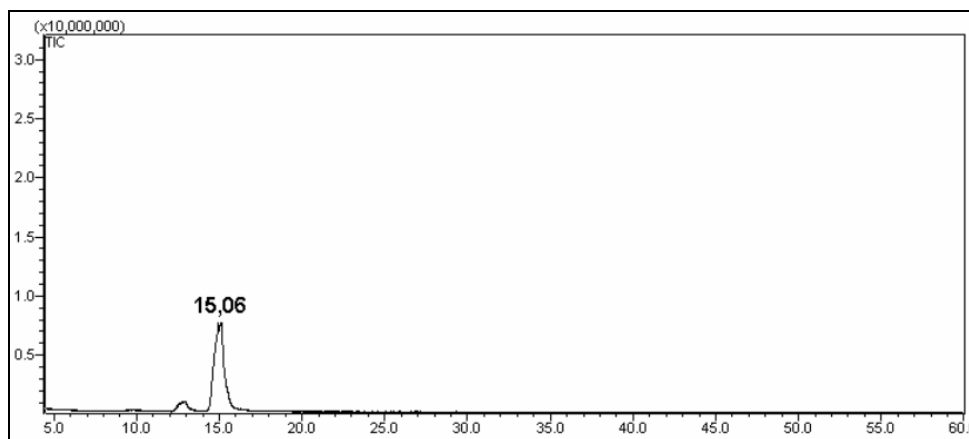


FIGURA 22: CROMATOGRAMA OBTIDO POR CG DO COMPOSTO β -SITOSTEROL.

5.5.4.1 Comparação da concentração do composto Estigmasterol nos processos de extração percolação, agitação em vortex e sonicação.

As análises quantitativas por CG/FID, permitiram calcular as concentrações do esteróide Estigmasterol, nos três diferentes processos de extração, a partir da área dos picos do Estigmasterol (tr de 13,67 min no extrato) dos extratos extrapolados em relação à curva de calibração. Os dados estão demonstrados na tabela 28 e sugerem não haver diferença significativa entre os processos de extração avaliados para o esteróide observado.

TABELA 28: COMPARAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO ESTIGMASTEROL NOS PROCESSOS DE EXTRAÇÃO NAS FLORES DE *C. officinalis*.

| Processo de extração | Conc. (mg/g) |
|----------------------|-----------------------|
| Percolação | $2,28 \times 10^{-2}$ |
| Agitação Vortex | $2,31 \times 10^{-2}$ |
| Sonicação | $2,86 \times 10^{-2}$ |

5.5.4.2 Comparação da concentração do composto β -Sitosterol nos processos de extração percolação, agitação em vortex e sonicação

As análises quantitativas por CG/FID, permitiram identificar e calcular as concentrações nos três diferentes processos de extração, a partir da área dos picos do esteróide β -Sitosterol (tr de 15,06 min) dos extratos, extrapolados em relação à curva de calibração. Os dados estão demonstrados na tabela 29 e sugerem não

haver diferença significativa entre os processos de extração avaliados para este esteróide.

TABELA 29: COMPARAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO SITOSTEROL NOS PROCESSOS DE EXTRAÇÃO NAS FLORES DE *C. officinalis*.

| Processo de extração | Conc. (mg/g) |
|----------------------|-----------------------|
| Percolação | $4,34 \times 10^{-2}$ |
| Agitação Vortex | $5,08 \times 10^{-2}$ |
| Sonicação | $4,59 \times 10^{-2}$ |

Baseado nos resultados obtidos, podemos concluir que os processos de extração percolação, agitação em vortex e sonicação analisados, podem serem utilizados nas fitopreparações sem comprometimentos em relação à concentração dos esteróides estigmasterol e β -sitosterol ou na atividade antibacteriana.

5.6. CONTROLE DA VARIAÇÃO SAZONAL:

Diversos fatores sazonais podem interferir diretamente na biossíntese e acúmulo dos metabólitos secundários em plantas, modificando sua ação farmacológica. Para a avaliação dos efeitos sazonais provocado nas flores de *C. officinalis* durante o período do ano de janeiro a dezembro de 2002, foram coletados exemplares da planta, variando-se o arbusto mas mantendo-se o mesmo canteiro. Para o estudo foram realizados estudos de rendimento de extração, atividade antibacteriana e perfil cromatográfico por meio de CLAE. Paralelamente a esta investigação, que trata especificamente da Calêndula cultivada na região dos Campos Gerais, foi realizado a investigação da Calêndula cultivada no Egito. A amostra da Calêndula egípcia foi obtida através de importação realizada pela empresa Santos Flora. O interesse em realizar a investigação paralela entre a Calendula paranaense e a egípcia surgiu decorrente da origem da planta em questão, posto que a mesma se originou inicialmente no Egito, conforme demonstra dados da literatura. Outro dado interessante fornecido por distribuidores da planta é que grande parte da Calêndula utilizada nas preparações farmacêutica industriais brasileiras é de origem egípcia.

5.6.1. Avaliação do rendimento obtido no processo de extração:

O rendimento em extrato bruto seco (em gramas), obtido por extração em aparelho de Soxhlet, utilizando como solvente extrator uma solução de metanol/água (90:10), apresentou um rendimento médio de 48,8 % (tabela 30)

TABELA 30: AVALIAÇÃO DO RENDIMENTO OBTIDO PARA O EXTRATO BRUTO DE *C. OFFICINALIS* NOS DOZE MESES DO ANO.

| <i>Mes</i> | <i>Massa</i> | <i>%</i> | <i>Mes</i> | <i>Massa</i> | <i>%</i> |
|------------|--------------|-------------------|------------|--------------|-------------------|
| | | <i>rendimento</i> | | | <i>rendimento</i> |
| Jan | 3,70 | 46,2 | Jul | 3,92 | 49,0 |
| Fev | 3,79 | 47,3 | Ago | 3,86 | 48,2 |
| mar | 4,01 | 50,1 | Set | 3,98 | 49,7 |
| Abr | 4,00 | 50,0 | Out | 3,84 | 48,0 |
| Mai | 3,69 | 46,1 | Nov | 3,93 | 49,1 |
| Jun | 4,10 | 51,2 | Dez | 4,05 | 50,6 |
| | | | Egípcia | 3,91 | 48,9 |

5.6.2 Avaliação da atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana, ensaiada para os microrganismos gram positivo e negativo, apresentou um perfil de sensibilidade semelhante para os extratos brutos de *C. officinalis*, coletado durante o ano de 2002. Com relação à *Calendula egípcia*, o exemplar coletado no mês de agosto é o que mais se assemelha em termos de grau de sensibilidade frente ao microorganismo *M. luteus*. Como não foi possível obter a informação sobre as condições climáticas em que o exemplar egípcio foi coletado, não tivemos parâmetros para comparações (tabela 31).

TABELA 31: AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DA VARIAÇÃO SAZONAL DE FLORES DE *C. officinalis* COLETADAS NOS DOZE MESES DO ANO UTILIZANDO-SE 3 mg/CAVIDADE (MÉTODO DE DIFUSÃO RADIAL EM ÁGAR - CAVIDADE)

| | | MICRORGANISMOS | | | | |
|--|----------|----------------------|------------------|------------------|------------------|----------------|
| | | <i>*P. mirabilis</i> | <i>S. aureus</i> | <i>M. luteus</i> | <i>B. cereus</i> | <i>E. coli</i> |
| M E S E S D O A N O | Jan | R | 12 | R | 14 | R |
| | Fev | R | 10 | R | 10 | R |
| | Mar | R | 10 | R | 12 | R |
| | Abr | R | 11 | R | 11 | R |
| | Mai | R | 10 | R | 10 | R |
| | Jun | R | 11 | R | 9 | R |
| | Jul | R | 12 | R | 11 | R |
| | Ago | R | 13 | 7 | 11 | R |
| | Set | R | 10 | R | 11 | R |
| | Out | R | 11 | R | 11 | R |
| | Nov | R | 11 | R | 10 | R |
| | Dez | R | 10 | R | 11 | R |
| | S. Flora | R | 11 | 7 | 11 | R |
| | VC | + | + | + | + | + |
| | C1 | R | R | R | R | R |
| | C2 | 17 | 18 | 18 | 21 | 20 |

*PR1 – *P. mirabilis* teve redução em todos os extratos

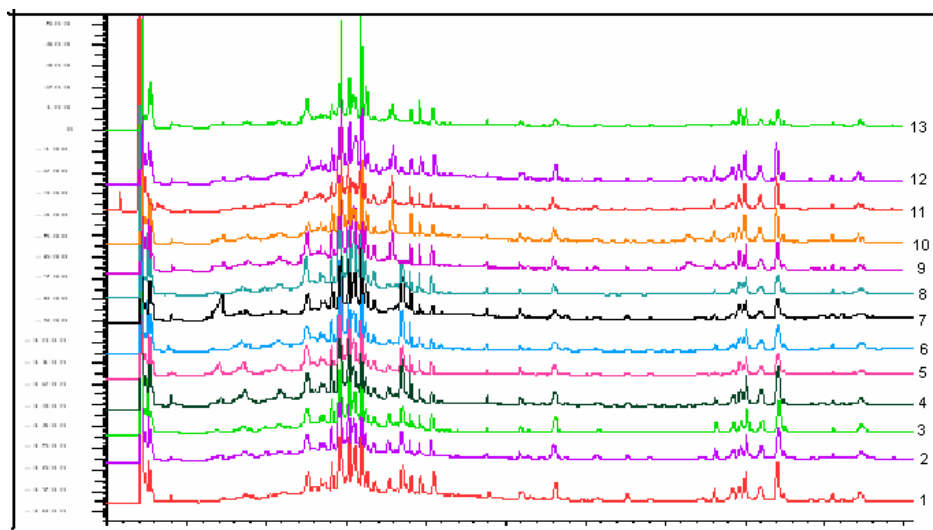
VC: viabilidade da cepa; R: Resistente; C1: controle negativo (DMSO); C2: Controle positivo (Cloranfenicol).

Resultados expressos em mm.

5.6.3 Avaliação do perfil cromatográfico em CLAE

A análise do perfil cromatográfico foi realizada no extrato bruto, na concentração de 1 mg/mL dissolvido em metanol. No perfil cromatográfico apresentado, a região de interesse está nos compostos com maior tempo de retenção entre 35 e 50 minutos, baseado na análise dos esteróides e triterpenos isolados do extrato.

Na avaliação do perfil dos cromatogramas obtidos no controle sazonal do extrato de calêndula, demonstrados na figura 13, através da expansão dessa região, foi possível constatar que não houve diferenças significativas no perfil cromatográfico entre os meses do ano. Os cromatogramas estão apresentados separadamente em anexo (fig. 33 - 45; pág. 109-16).



1- jan; 2- fev; 3- mar; 4- abr; 5- mai; 6- jun; 7- jul; 8- ago;
9- set; 10- out; 11- nov; 12- dez; 13- egipcia.
FIGURA 23: AVALIAÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DA TINTURA NOS DOZE MESES DO ANO (EIXO Y= ABSORBÂNCIA / EIXO X= TEMPO DE RETENÇÃO).

De acordo com os registros realizados nos períodos de coleta, foi observado que, no decorrer deste ano especificamente, não ocorreram mudanças climáticas drásticas, onde tanto o verão como o inverno manteve temperaturas amenas. Para um estudo mais aprofundado, seria recomendado que o controle sazonal se estendesse por um período mais prolongado.

5.7 INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL TOXICOLÓGICO

A investigação foi realizada por duas vias de administração diferentes: oral e intra-peritoneal.

5.7.1 Toxicidade Via Oral

O extrato bruto de *C. officinalis* foi administrado pela via oral, na concentração de 5.000 mg/Kg de rato. A análise dos resultados revelou que não houve alterações perceptíveis no comportamento dos animais, não apresentando indícios de toxicidade.

5.7.2 Toxicidade Via Intra-Peritoneal

O extrato bruto de *C. officinalis* foi administrado, pela via IP, nas seguintes concentrações: 5.000 mg/Kg, 2.500 mg/Kg, 1.250 mg/Kg, 625 mg/Kg e 300 mg/Kg.

Os animais investigados apresentaram significativa perda de peso durante o período de tratamento com o extrato de Calêndula. Os resultados foram tratados estatisticamente pelo teste *t* de *Students* apresentando um $p < 0,01$.

Baseado nos resultados obtidos pode observar que os níveis de segurança apresentados para o uso do extrato de Calêndula, por esta via de administração, é inferior a 625 mg e superior a 300 mg/Kg de rato.

A avaliação do potencial toxicológico permitiu visualizar o efeito nocivo do extrato bruto das flores de *Calendula officinalis* produzido em animais de laboratório, nas seguintes dosagens de extrato por Kg de rato: 5.000 mg/Kg, 2.500 mg/Kg, 1.250 mg/Kg e 625 mg/Kg (tabela 32). O estudo revelou toxicidade e um expressivo índice de mortalidade. Quanto ao peso, observou-se redução significativa de peso para o grupo tratado com o extrato de Calêndula.

TABELA 32: ÍNDICES DE MORTALIDADE

| DOSAGEM | FÊMEAS | | MACHOS | | % MORTALIDADE TOTAL |
|------------|---------|----------|---------|----------|---------------------|
| | 6 h (%) | 14 d (%) | 6 h (%) | 14 d (%) | |
| 5000 mg/Kg | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 |
| 2500 mg/Kg | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 |
| 1250 mg/Kg | 80 | 20 | 100 | 0 | 100 |
| 625 mg/Kg | 40 | 0 | 20 | 0 | 60 |
| 300 mg/Kg | 0 | 0 | 0 | 20 | 20 |

5.8 INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO

A investigação do potencial mutagênico promovido pela administração do extrato bruto de *C. officinalis* foi realizada pelo teste de micronúcleos (estudo agudo e sub-agudo, ambos com administração oral e intra-peritoneal) e pelo teste de Ames, utilizando a cepa de *S. Typhimurium* TA 100.

5.8.1 Teste do Micronúcleo

5.8.1.1 Estudo agudo

O extrato de Calêndula (100 mg/Kg) assim como a solução salina (controle negativo) e a solução de mitomicina C[®] (controle positivo) foram administradas 36 horas antes do sacrifício dos animais.

5.8.1.1.1 Administração via oral

A análise estatística, realizada por meio do Teste de Kruskal-Wallis, referente a contagem de micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*, com extrato de calêndula (MN em 1000 NCE, 1000 PCE , 1000 E) revelou que os resultados obtidos não apresentaram diferenças estatísticas para o controle negativo ou positivo, apresentando um ($P \leq 0,01$). Neste experimento os resultados não indicaram claramente se o tratamento induz ou não a mutagenicidade.

5.8.1.1.2 Administração via intra-peritoneal

Análise estatística realizada por meio do Teste de Kruskal-Wallis, referente a contagem de micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*, com extrato de calêndula (MN em 1000 NCE, 1000 PCE , 1000 E). Assim como no experimento do teste agudo pela via de administração oral, os resultados revelaram que não houve diferenças estatísticas entre o extrato de Calêndula e o controle positivo e controle negativo, porém o controle positivo difere do controle negativo. Sendo assim, não ficou esclarecido, neste experimento, se o extrato de calêndula causa ou não mutagenicidade.

5.8.1.2. Estudo sub-agudo:

O extrato de Calêndula (100 mg/Kg) assim como a solução salina foi administrada por um período de 9 dias, com intervalo de 24 horas entre as aplicações. A solução de mitomicina C[®] foi administrada 36 horas antes do sacrifício dos animais.

5.8.1.2.1 Administração via oral:

Análise estatística, realizada por meio do Teste de Kruskal-Wallis, referente a contagem de micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*, com extrato de calêndula – MN em 1000 NCE, 1000 PCE , 1000 E. Os resultados revelaram que não houve diferenças estatísticas entre o extrato de Calêndula e o controle positivo e controle negativo, porém o controle positivo difere do controle negativo. Sendo

assim, não ficou esclarecido neste experimento se o extrato de calêndula causa ou não mutagenicidade.

5.8.1.2.2. Administração via intra-peritoneal:

Na avaliação de micronúcleo em medula óssea, avaliado pelo teste *t* de *Students*, as médias obtidas no grupo teste com calêndula e o grupo controle positivo com Mitomicina C[®] não diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$). Os resultados revelaram que o controle positivo (Mitomicina C[®]) foi estatisticamente semelhante ao extrato de Calêndula, ou seja, a Calêndula induz a formação de micronúcleos sugerindo ser este, um agente genotóxico, nas condições experimentais deste estudo.

Na avaliação de micronúcleo em sangue, avaliado pelo teste ANOVA, as médias obtidas no grupo teste com calêndula e o grupo controle positivo com Mitomicina diferem estatisticamente entre si ($p = 0,1276$), indicando como resultado uma ação não-mutagênica para o extrato de calêndula, nas condições experimentais deste estudo.

Na investigação em células do sangue, os resultados encontrados não revelaram diferenças significativas entre os grupos testados. Este fato pode estar relacionado à ação do baço que é o órgão responsável por “seqüestrar” células mutantes, ou ainda pelo fato de ser necessário um período de 24 horas a mais para a pesquisa destes micronúcleos na corrente circulatória.

5.8.2. Teste de Ames frente à *Salmonella typhimurium*:

De acordo com os resultados obtidos no experimento, expostos na tabela 33 observam-se que no teste de Ames não houve diferença significativa entre as colônias revertentes no grupo teste e no grupo controle ($p < 0,001$), apontando para um efeito não mutagênico.

Observa-se no modelo polinomial ajustado, conforme a figura 14, representando bem o fenômeno analisado, onde o coeficiente de regressão obtido ($r^2 = 0,92$) se aproxima da unidade.

TABELA 33: AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO MUTAGÊNICO DO EXTRATO BRUTO DE *C. OFFICINALIS* FRENTE A CEPA TA 100 (*Salmonella typhimurium*).

| Dose | Contage m 1 | Contage m 2 | Contage m 3 | Contagem Média | Contagem Prevista |
|------|----------------|----------------|----------------|-------------------|----------------------|
| 0 | 180 | 171 | 180 | 177.00 | 177.00 |
| 12.5 | 138 | 164 | 169 | 157.00 | 149.73 |
| 25 | 125 | 113 | 113 | 117.00 | 130.87 |
| 50 | 118 | 117 | 150 | 128.33 | 118.37 |
| 75 | 142 | 120 | 146 | 136.00 | 139.49 |
| 100 | 164 | 216 | 204 | 194.67 | 194.24 |

6 CONCLUSÕES

- A investigação da atividade antimicrobiana do extrato obtido das flores de *Calendula officinalis* comprovou que a atividade está presente para as bactérias patogênicas gram positivos em cepas padrão, sendo pouco efetivos contra gram negativos. O estudo revelou ainda que esta atividade se concentra principalmente nas frações menos polares da planta, ou seja, nas frações hexânica e diclorometano. Estudos cromatográficos revelaram que ambas as frações são ricas em esteróides e triterpenos;
- O potencial antibacteriano frente à bactéria gram positivo da cepa padrão de *Staphylococcus aureus*, apresentado para a fração apolar, não se repetiu quando testado em cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus*, mostrando-se pouco ativo. Neste estudo foi possível observar que esta fração apolar só foi ativa nas cepas que foram sensíveis à ação da Penicilina e Ampicilina;
- O isolamento biomonitorado das frações que apresentaram atividade antibacteriana foi realizado por meio de técnicas cromatográficas clássicas, sendo identificados, até o momento, os seguintes compostos: na sub-fração Ap- acetato de etila: o esteróide Estigmasterol e os triterpenos Lupeol, Palmitato de Faradiolila e α -Amirina . Na subfração Ap-metanólica: os esteróides β -Sitosterol e Estigmasterol, os triterpenos α e β Amirina em mistura. As demais substâncias isoladas estão em processo de identificação e não fizeram parte da nossa discussão;
- O controle sazonal realizado nos doze meses do ano para o teor de sólidos totais, perfil cromatográfico em CLAE e controle da atividade antibacteriana veio de encontro aos dados da literatura, que se referem à Calêndula como sendo uma planta que pode ser coletada durante todo o ano. Quando confrontado estes dados com aqueles obtidos para a Calêndula de origem egípcia percebemos que a adaptação da planta no Brasil não interferiu na composição química da planta ou na sua atividade antimicrobiana;

- Com relação aos diferentes processos de extração realizados observa-se que, para o processo de percolação, agitação em vortex e sonicação, não ocorreu diferenças significativas quando foram analisados o potencial antibacteriano ou perfil cromatográfico por CLAE. Os esteróides Estigmasterol e β -Sitosterol foram quantificados por meio de CG-EM, onde se observou que a concentração destes compostos varia de forma insignificante nos três processos de extração, quando analisados sob as mesmas condições;
- Embora a utilização do extrato bruto da planta pela via oral não tenha apresentado indícios de toxicidade, a avaliação do potencial toxicológico pela via intra-peritoneal permitiu visualizar o efeito nocivo do extrato bruto das flores de *Calendula officinalis* produzido em animais de laboratório. Este estudo necessita de complementação com a finalidade de se esclarecer qual é a classe de compostos responsável pelo efeito apresentado, posto que seu extrato é rico em saponinas triterpênicas, sendo que estas são comprovadamente hemolíticas. Recomenda-se a utilização com cautela devido à toxicidade apresentada;
- O estudo do potencial mutagênico agudo realizado pelo teste de micronúcleos, pelas vias oral e intra-peritoneal bem como o estudo sub-agudo pela via oral, não demonstraram mutagenicidade. Porém, o estudo da atividade mutagênica sub-agudo, pela via intra-peritoneal, revelou sinais de mutagenicidade para animais de laboratório. O ensaio realizado pelo teste de Ames não revelou mutagenicidade;
- Tendo em conta que a Calêndula se adapta bem nas condições de cultivo, com bons resultados agrotécnicos e que avaliações físicas, químicas e farmacognósticas correspondem com o informado na literatura nacional e internacional, podemos afirmar que a Calêndula cresce na nossa região com as condições necessárias para a sua comercialização e pode ser utilizada para a obtenção de extratos que se utilizam na confecção de fitofármacos e fitocosméticos em ampla demanda e boas potencialidades de comercialização.

7. REFERÊNCIAS:

- ABAD, M. J.; BERMEJO, P.; VILLAR, A. An approach to the genus *Tanacetum* L. (Compositae): phytochemical and pharmacological review. **Phytother. Res.**, London, v.9, p. 78-92. 1995.
- AFOLAYAN, A. J.; MEYER, J. J. M. The antimicrobial activity of 3,5,7-trihydroxyflavone isolated from the shoots of *Helichrysum aureonitens*. **J. Ethnopharmacol.** v. 57, p.177–181. 1997.
- AHMED, A. A.; MAHMOUD, A. A.; WILLIAMS, H. J.; SCOTT, A. I.; REIBENSPIES, J. H.; MABRY T. J. New sesquiterpene α -methylene lactones from the Egyptian plant *Jasonia candicans*. **J. Nat. Prod.** v. 56, p.1276–1280. 1993.
- ALMEIDA, E. R. **Plantas medicinais brasileiras**. São Paulo: Hemus, 1993. p.341.
- AMARAL, J. A., EKINS, A.; RICHARDS, S. R.; KNOWLES, R.. Effect of selected monoterpenes on methane oxidation, denitrification, and aerobic metabolism by bacteria in pure culture. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 64, p.520–525. 1998.
- AMES, B. N. The detection of chemical mutagens with enteric bacteria. In: HOLLAENDER, A. **Chemical Mutagens: Principles and methods for their detection**. New York, plenum. V.1, p. 267-282. 1971.
- AMES, B. N.; McCANN, J. Validation of the Salmonella test: A reply to rinkus and legator. **Cancer Res.**, v. 41, p. 4192-4196. 1981.
- AMOROS, M.; SIMOES, C. M. O.; GIRRE, L. *et al.*. Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. **J. of Natural Products**, v. 55, n.12, p.1732-1740. 1992.
- ANDREEVA, L. G. Localization and content of carotenoids in highly productive forms of *Calendula officinalis*. **Aptechnoe. Delo.** v. 10, p.46. 1961.
- APISARIYAKUL, A.; VANITTANAKOM, N.; BUDDHASUKH, D. Antifungal activity of turmeric oil extracted from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). **J. Ethnopharmacol.** v. 49, p. 163–169. 1995.

AQUINO, R.; DE FEO, V.; DE SIMONE, F.; PIZZA, C. CIRINO, G. Plant metabolites new compounds and anti-inflammatory activity of *Uncaria tomentosa*. **Journal of Natural Products**, v. 54, n. 2, p. 453-459. 1991.

ARMOND, C. **Produção e teor de óleos essenciais da Calêndula (*Calendula officinalis* L.) cultivada em compostos orgânicos de diferentes resíduos.** Viçosa, UFV, 1998. 20p.

ATTA-UR-RAHMAN, CHOUDHARY, M. I. Diterpenoid and steroidal alkaloids. **Nat. Prod. Rep.** v. 12, p. 361-379. 1995.

AYAFOR, J. F., TCHUENDEM, M. H. K.; NYASSE, B. Novel bioactive diterpenoids from *Aframomum aulacocarpos*. **J. Nat. Prod.** 57:917-923. 1994.

BALBACH, A. **As plantas curam.** 24 ed. São Paulo: M. V. P. p. 181-182, 1968.

BALLS, A. K., HALE, W. S.; HARRIS, T. H. A crystalline protein obtained from a lipoprotein of wheat flour. **Cereal Chem.** v. 19, p. 279-288. 1942.

BARRE, J. T., BOWDEN, B. F.; COLL, J. C.; JESUS, J.; FUENTE, V. E.; JANAIRO, G. C.; RAGASA, C. Y.. A bioactive triterpene from *Lantana camara*. **Phytochemistry**, v.45, p. 321-324. 1997.

BARROSO, G. M. Compositae. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 32, p. 171-241. 1996.

BARRY, A. L. Procedure for testing antimicrobial agents in agar media: Theoretical considerations. **In Lorian**, p.1. 1986.

BATISTA, O.; DUARTE, A.; NASCIMENTO, J.; SIMONES, M. F. Structure and antimicrobial activity of diterpenes from the roots of *Plectranthus hereroensis*. **J. Nat. Prod.**, v. 57, p. 858-861. 1994.

BAUER, R.; TITTEL, G., Quality assessment of herbal preparations as a precondition of pharmacological and clinical studies. **Phytomedicine**, v.2, p.193-198. 1996.

BERKADA, B. Preliminary report on warfarin for the treatment of herpes simplex. **Phys. Surg.** v. 22, p. 56. 1978.

BEZAKOVA, L.; MASTEROVÁ, I; PAULIKOVA, I. *et al.*. Inibitory activity of isorhamnetin glycosides from *Calendula officinalis* L. on the activity of lipoxxygenase. **Pharmazie**, v. 51, p.126-7. 1996.

BOSE, P. K. On some biochemical properties of natural coumarins. **J. Indian Chem. Soc.**, v. 58, p.367–375. 1958.

BOYADZHIEV, T.; VISSH N. Sedative and hypotensive effect of preparations from the plant *Calendula officinalis*. **Med Int Sofia.**, v. 43, p.15-20. 1964.

BRANTNER, A., MALES, Z.; PEPELJNJAK, S.; ANTOLIC, A. Antimicrobial activity of *Paliurus spina-christi* mill. **J. Ethnopharmacol.**, v. 52, p. 119–122. 1996.

BRAZ FILHO, R. Química de produtos naturais: importância, interdisciplinaridade, dificuldades e perspectivas. **Quím. Nov.**, v. 17, n. 5, p. 405-445. 1994.

BRITISH PHARMACOPEIA. London : General Medical Council, 1953. p. 573-574.

BRITO, A.R.M.S. **Toxicidade aguda (dose simples)**. In: Manual de ensaios toxicológicos in vivo. Campinas: Editora da Unicamp, Rio de Janeiro: Editora Três, 1994. A. p.15-22

BRUSICK, D.J.; YOUNG, R.R. **Procedures**: Manual Level. Environmental Assessment Biological tests (EPA-600/8-81-024), NTISPB 82-228966, Litton Biogenetics, Inc.; Kesington, MD. 1981.

BUCKEL, P.; Toward A. New natural medicine. **Naturwissenschaften**, v. 85, n. 4, p. 155-63. Apr, 1998.

BULETIN OF THE WORLD HEALTH ORGANIZATION. Regulatory situation of herbal metcines. **A worldwide Review**, Geneva, 1998.

BUTLER, L. G. Effects of condensed tannin on animal nutrition, *In* R. W. Hemingway and J. J. Karchesy (ed.), **Chemistry and significance of condensed tannins**. New York: Plenum Press. 1988. p. 553.

CALIXTO, J. B. Biopirataria. **Ciência Hoje**, v. 31, n. 28, p. 36 – 43, dez. 2000.

CAPASSO, R.; IZZO, A. A.; PINTO, L.; BIFULCO, T.; VITOBBELLO, C.; MASCOLO, N. Phytotherapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia**, v. 71, n. 1, p. 58-65. 2000.

CASTRO, J. L. **Medicina vegetal**: teoria e prática conforme a naturopatia. 2 ed. Europa-América. 1981, p. 150.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a Obtenção de Compostos Farmacologicamente Ativos a Partir de Plantas Medicinais, Conceito sobre Modificação Estrutural para Otimização da Atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99. 1998.

CHANG, H. M.; YEUNG, H W.; TSO, W.; KOO, A. **Advance in chinese medicinal materials research**, Eds. Word scientific publishing Co. Philadelphia Pa. 210 p.

CHATONET, J. **As plantas medicinais**: preparo e utilização. São Paulo: Martins Fontes, 1983.

CHAUURASIA, S. C.; VYAS, K. In vitro effect of some volatile oil against *Phytophthora parasitica* var. *piperina*. **J. Res. Indian Med. Yoga Homeopath**. p. 24–26.1977.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. **Antibiotics in laboratory medicine**. Philadelphia: Willians & Wilkins, v. 3, 1991, p. 739.

COLEGATE, S. M.; MOLYNEUS. R. J. **Introduction and Overview**. in: Bioative Natural Compounds, Ed. Colegate, S. M., Molyneux, R. J. CRC Press, USA, 1993.

COLILLA, F. J.; ROCHER, A.; MENDEZ, E. Gamma-purothionins: amino acid sequence of two polypeptides of a new family of thionins from wheatendos perm. **FEBS Lett**. v. 270, p. 191–194. 1990.

CORREA JUNIOR, C.; MING, L. C.; SCHEFFER, M. C. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. Curitiba, Emater - PR. 1991.

CORRÊA, C.; MING, L. C.; SCHEFFER, M. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. 2 ed. Jaboticabal: FUNEP, 1994.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinic Microbiol. Rev**. v. 12, n. 4, p.564. 1999.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981.

CRONQUIST, A. The Compositae revisited. **Brittonia**, Bronx, v. 29, n. 2, p. 137-153, 1977.

CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. 2º ed. New York : Botanical Garden Published, 1988.

CUBAS, M. R. **Revisão bibliográfica sobre a *Calendula officinalis* L.** Curitiba, Monografia (Curso de Especialização em Fitofármacos e Fitoterapia) - Escola de Saúde Pública do Paraná, Fundação Caetano Munhoz da Rocha, Secretaria do Estado do Paraná. 1990. 31 p.

DAVIS, P.; **Aromaterapia**, São Paulo: Martins Fontes, 1996.

DE BOLLE, M. F., OSBORN, R. W.; GODERIS, I. J.; NOE, L.; ACLAND, D.; HART, C. A.; TORREKENS, S.; VAN LEUVEN, F.; BROEKART, N. F. Antimicrobial properties from *Mirabilis jalapa* and *Amaranthus caudatus*: expression, processing, localization and biological activity in transgenic tobacco. **Plant Mol. Biol.**, v. 31, p.993–1008. 1996.

DELLA LOGGIA, R.; TUBARO, A.; SOSA, S. The role of triterpenoids in the topical anti-inflammatory activity of *Calendula officinalis* flowers. **Planta Med.**, v. 60, n. 6, p. 516. 1994.

DILLON, M. O. Compositae. In: MACBRIDE, J. F. and collaborators. Flora of Peru. Chicago: **Fieldiana Bot.**, v. 5, p. 12-21, 1980.

DIXON, R. A., P. M. DEY, AND C. J. LAMB. Phytoalexins: enzymology and molecular biology. **Adv. Enzymol.**, v. 55, p. 1–69. 1983.

DUKE, J. A. **Handbook of medicinal herbs**. Boca Raton, CRC Press, Inc., Fla. 1985.

DUMENIL G. Evaluation of antibacterial properties of *Calendula officinalis* flowers and mother homeopathic tinctures of *C. officinalis*. **Ann Pharm.** v. 38, n. 6, p.493-9. 1980.

ESCHRICH, Walter. **Pulver-atlas der drogen der deutschsprachigen arzneibucher**. Stuttgart: Gustav Fisher. 1997, p. 238-239.

ESPINEL-INGROFF, A.; PFALLER, M. A. In: Murray, P. R.; Baron, E. J.; Pfaller, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. **Manual of clinical microbiology**, 6 ed., Washington: C.V. Mosby. 1995.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 3º Ed. Revisada. Parte II. São Paulo: Andrei, 2003.

FESSENDEN, R. J.; FESSENDEN, J. S.. **Organic chemistry**, 2nd. Boston: ed Willard Grant Press, Mass. 1982.

FONSECA, A. L. **Antibióticos na Clínica Diária**. 6 ed. Rio de Janeiro: EPUB. 1999.

FONT-QUER, P. **Plantas medicinales: El dioscórides renovado**. 10 ed. Ed. Labor. 1987. p. 832-33.

FORGO, P.; KÖVÉR, K. E. Gradient enhanced selective experiments in the ^1H NMR chemical shift assignment of the skeleton and side-chain resonances of stigmasterol, a phytosterol derivative. **Steroids**, v. 69, n. 1, p. 43–50. 2004.

FREIBURGHHAUS, F.; KAMINSKY, R.; NKUNYA, M. H. H.; BRUN, R. Evaluation of African medicinal plants for their *in vitro* trypanocidal activity. **J. Ethnopharmacol.**, v. 55, p.1–11. 1996.

FUJIOKA, T.; KASHIWADA, Y.. Anti-AIDS agents. 11. Betulinic acid and platanic acid as anti-HIV principles from *Syzygium claviflorum*, and the anti-HIV activity of structurally related triterpenoids. **J. Nat. Prod.** v. 57, p. 243–247. 1994.

GAMBER, D.; SPITELLER, G. **Planta Médica.**, v. 61, p. 138-40. 1995.

GEISSMAN, T. A. **Flavonoid compounds, tannins, lignins and related compounds**, In M. Florkin and E. H. Stotz (ed.), Pyrrole pigments, isoprenoid compounds and phenolic plant constituents, vol. 9. New York, N.Y.: Elsevier, 1963. p.265.

GHOSHAL, S.; KRISHNA PRASAD, B. N.; LAKSHMI, V. Antiamoebic activity of *Piper longum* fruits against *Entamoeba histolytica* in vitro and in vivo. **J. Ethnopharmacol.**, v. 50, p. 167–170. 1996.

GRACZA, L. Oxygen- containing terpene derivatives from *Calendula officinalis*. **Planta Med.**, v. 53, n. 2, p. 227. 1986.

GRENAND, P.; MORETI, C.; JACQUEMIN, H. **Pharmacopees traditionnelles en Guyane**. Paris: l'ORSTROM. 569 p. 1987.

HADSON, V. Qualitative and quantitative analysis of flavonoids in plant products of cosmetic interest. **Clujul Med**. v. 58, n. 4, p. 378-9-81. 1985.

HAMBURGER, H.; K. HOSTETTMANN. The link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v. 30, p. 3864–3874. 1991.

HARBORNE J. B.; BAXTER H. **Phytochemical dictionary**: A handbook of bioactive compounds from plants. London: Taylor & Frost. 1983, 791p.

HASEGAWA, H.; MATSUMIYA, S.; UCHIYAMA, M.; KUROKAWA, T.; INOUE, Y.; KASAI, R.; ISHIBASHI, S.; YAMASAKI, K. Inhibitory effect of some triterpenoid saponins on glucose transport in tumor cells and its application to in vitro cytotoxic and antiviral activities. **Planta Med.**, v. 6, p. 240–243. 1994.

HATINGUAIS, P. *et al.*. Hypocholesterolemic saponin. **P. F. Medicament**, v. 84, p. 12. 1984.

HEDDLE, J. A. A rapid *in vivo* test for chromosomal damage. **Mutation. Res.**, v. 18, p. 187-190. 1973.

HERTZ, W. **Pseudoguaianolides in Compositae**. In: MABRY, T. J.; ALSTON, R. E.; RONECKLES, V. C.; eds. Recent advances in phytochemistry. New York: Appleton-Century-Crofts, v. 1. 1968.

HIMEJIMA, M.; HOBSON, K. R.; OTSUKA, T.; WOOD, D. L.; KUBO, I. Antimicrobial terpenes from oleoresin of ponderosa pine tree *Pinus ponderosa*: a defense mechanism against microbial invasion. **J. Chem. Ecol.**, v. 18, p. 1809–1818. 1992.

HUANG, K. C. **The pharmacology of chinese herbs**. Boca Raton, CRC Press, Fl 388 p. 1993.

HUTCHINSON, J. **The families of flowering plants: arranged according to a new system based on their probable phylogeny**. 3 ed. Oxford: Clarendon Press, 1973.

JEFFREY, C. Asterales. In: Heywood, v. h. Ed. **Flowering plants of the world**. Oxford: Oxford University Press, 1978.

JOLY, A. B. **Botânica**: introdução à taxonomia vegetal. 10 ed. São Paulo: Ed. Nacional. 1991.

JOLY, A. B. **Botânica**: Introdução a taxonomia vegetal. 5 ed. São Paulo: Ed. Nacional, 1979. p. 628-30.

JONES, S. B.; LUCHSINGER, A. E. **Plant systematics**. New York, N.Y.: McGraw-Hill Book Co., 1986.

JORGE, R. M.; LEITE, J. P. V.; OLIVEIRA, A. B.; TAGLIATI, C. A.; Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*. **J Ethnopharmacol.**, v. 94, n. 1, p.93-100. 2004

KAVALTCHEV, Z.; WALDER, R.; GARZARO, D. Anti-HIV activity of extracts from *Calendula officinalis* flowers. **Biomed. Pharmacother.**, v. 51, n 4, p. 176-80. 1997.

KEELER, R. F.; TU, A. T. **Toxicology of plant and fungal compounds** (Handbook of natural toxins) vol. 6 Marcel Dekker, Inc. NY. 655p. 1991.

KEVILLE, K. **Herbs an illustrated encyclopedia**: A complete culinary, cosmetic, medicinal, and ornamental guide. USA: Magda Books, 1995. p.54.

KHALID, S. A.; FAROUK, A.; GEARY, T. G.; JENSEN, J. B. Potential antimalarial candidates from african plants: An in vitro approach using plasmodium falciparum. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 15, p. 201-209. 1986.

KLOPOUKH, L., SIDDIQI, S.; WARNS, M.; TO, L. Growth inhibition of *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium marinum* by plant compounds, abstr. A-199. In Abstracts of the 97th General Meeting of the American Society for Microbiology. Washington, D.C.: **American Society for Microbiology**. 1997.

KLOUSCHEK-POPOVA, E.; POPOV, A.; PAVLOVA, N. *et al.*. Influence of the physiological regeneration and epithelialization using isolated from *Calendula officinalis*. **Acta Physiol. Pharmacol. Bulg.**, v.8, n. 4, p.63-7. 1982.

KOMISSARENKO, N. F. *et al.*. Flavonoids of inflorescences of *Calendula officinalis*. **Khim. Pri. Soedin.** v. 6, p. 795-801. 1988.

KRAGH, K. M., NIELSEN, J. E.; NIELSEN, K. K.; DREBOLDT, S.; MIKKELSEN, J. D. Characterization and localization of new antifungal cysteine-rich proteins from *Beta vulgaris*. **Mol. Plant-Microbe Interact.** v. 8, p. 424–434. 1995.

KUBO, I., MUROI, H.; HIMEJIMA, M. Combination effects of antifungal nagilactones against *Candida albicans* and two other fungi with phenylpropanoids. **J. Nat. Prod.**, v. 56, p. 220–226. 1993.

LAWRENCE, G. H. M. **Taxonomia das plantas vasculares**. v. 2., Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 1951.

MADAUS, G. **Lehrbuch der biologischen hitfmittel**. Georg Olms Verlag, Hildesheim. Madaus. vol 1-3. 1976, 2862 p.

MADHAVI, D. L.; BOMSER, J.; SMITH, M.; SINGLETARY, K. isolation of bioactive constituents from *Vaccinium myrtillus* (Bilberry) fruits and cell cultures. **Plant Sci.**, v. 131, n. 1, p. 95-103. 1988.

MAHATO, S. B.; SARKAR, S. K.; PODDAR, G. Triterpenoid saponins. **Phytochemistry**, v. 27, n. 10, p. 3037-3067. 1988.

MANOLOV, P.; BOYADZHIEV, T.; NIKOLOV, P. Antitumorigenic effect of preparations of *Calendula officinalis* on Crocker sarcoma 180. **Eksperim Med Morfol.**, v. 3, p.41-5. 1964.

MASCOLO; N.; AUTTORE, G.; CAPASSO, F.; MENGHINI, A.; FASULO, M. P. Biological screening of Italian medicinal plants for antiinflammatory activity. **Phytother. Rev.**, v. 1, p. 28-31. 1987.

MASON, T. L.; WASSERMAN, B. P. Inactivation of red beet betaglucan synthase by native and oxidized phenolic compounds. **Phytochemistry**, v. 26, n. 2197–2202. 1987.

MASTEROVÁ, I. *et al.*. Flavonoids in flowers of *Calendula officinalis* L. **Chem. Pap.**, v. 45, n. 1, p. 105-8. 1991.

MCDEVITT, J. T.; SCHNEIDER, D. M.; KATIYAR, S. K.; EDLIND, T. D. Berberine: a candidate for the treatment of diarrhea in AIDS patients, abstr. 175. *In* Program and Abstracts of the 36th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Washington, D.C.: **American Society for Microbiology**. 1996.

MENDEZ, E.; MORENO, A.; COLILLA, F.; PELAEZ, F.; LIMAS, G. G.; MENDEZ, R.; SORIANO, F.; SALINAS, M.; DE HARO; C. Primary structure and inhibition of

protein synthesis in eukaryotic cell-free system of a novel thionin, gamma-horothionin, from barley endosperm. **Eur. J. Biochem.**, v. 194, p. 533–539. 1990.

MENDOZA, L.; WILKENS, M.; URZUA, A. Antimicrobial study of the resinous exudates and of diterpenoids and flavonoids isolated from some Chilean *Pseudognaphalium* (Asteraceae). **J. Ethnopharmacol.**, v. 58, p. 85–88. 1997.

MESELSON, M.; RUSSEL, K. Comparisons of carcinogenic and mutagenic potency. In: H. H. HIAT, J. D. WATSPM, J. A. WINSTEN (ed). *Origins of Human Cancer*, New York, Book C.: **Cold Spring Harbor Laboratory**. pp. 1473-1481. 1977.

MIRONIVA, V. N. **Farmacol. Toksikol.**, v. 45, n. 45. 1982.

NAMBA, T. O.; MORITA, S; HUANG, K.; GOSHIMA, M.; KAKIUCHI. Studies on cardio-active crude drugs. I. Effect of coumarins on cultured myocardial cells. **Planta Med.** v. 54, p. 277-282. 1988.

NCCLS (NACIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORU STANDARDS). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. 2004; 24: 1.

NES, W. D.; NORTON, R. A.; BENSON, M. Carbon-13 RMN studies on sitosterol biosynthesized from [¹³C] mevalonates. **Phytochemistry**. v. 31. n. 3., p. 805-811. 1992.

NEWMARK, T. M.; SCHULICK, P. **Herbal Cox-2 inhibition** – nature's challenge to arthritis, cancer & alzheimer's disease. Hohm Press, Prescott AZ. 2000.

NIGG, H. N.; SEIGLER, D. S. **Phytochemical resources for medicine and agriculture**. New York: Plenum Press. 1992, 455p.

O'KENNEDY, R.; THORNES, R. D. (ED.). **Coumarins**: biology, applications and mode of action. New York, N.Y.: John Wiley & Sons, Inc. 1997.

OCIOSZIYNSKA, Y. Study of the chemistry of *C. officinalis* fluorescences. **Herba Pol.**, v. 23, n. 3, p. 191-9. 1977.

OLEA, R. S. G.; ROQUE, N. F. Análise de misturas de triterpenos por RMN de ¹³C, **Química Nova**. v. 31, n 4. 1990.

OLIVEIRA, M.G.M.; MONTEIRO, M.G.; MACAÚBAS, C.; BARBOSA, V.P.; CARLINI, E.A., Pharmacologic and toxicologic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. **J.Ethnopharmacol.**, v. 34, p. 29-41. 1991.

OMULOKOLI, E.; KHAN, B.; CHHABRA, S. C. Antiplasmodial activity of four Kenyan medicinal plants. **J. Ethnopharmacol.**, v. 56, p. 133–137. 1997.

PANDEY, D. K.; TRIPATHI, N. N.; TRIPATHI, R. D.; DIXIT, S. N. **Angel Botanik**, v. 56, p. 259-67. 1982.

PARKURST, R. M.; STOLZENBERG, S. I. Stanford Research Institute. **Saponin containing spermatocidal composition** U.S. 3.866.272 Appl 384, 101. 1973. Jul 30.

PELKZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. **Microbiologia**. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, 1980.

PENNA, M. *Calendula officinalis*. In: **Notas sobre plantas brasileiras**. Rio de Janeiro: Araújo Penna Filhos. 1921, p. 67-9.

PITLER, N. B. A comparison of the effectiveness of some anti-inflammatory drugs on thermal oedema. Br. **J. Exp. Pathol.** v. 56, p. 554–559. 1975.

RAHALISON, L.; HAMBURGUER, M.; MONOD, M.; FRENK, E.; HOSTETMANN, K. Antifungal tests in phytochemical investigations: comparison of bioautographic methods using phytopathogenic and human pathogenic fungi. **Planta Med.**, v. 60, p. 41. 1994.

RAMOS, A.; EDREIRA, A.; VIZOSO, A.; BETANCOURT, J.; LÓPEZ, M.; DÉCALO, M. *Genotoxicity of an extract of Calendula officinalis* L.,. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 61, p. 49. 1998.

RAO, K. V.; SREERAMULU, K.; GUNASEKAR, D.; RAMESH, D. Two new sesquiterpene lactones from *Ceiba pentandra*. **J. Nat. Prod.**, v. 56, p. 2041–2045. 1993.

ROCAUD-MAITRE, A. Citotoxic and antitumoral activity of *C. officinalis* extracts. **Pharmazie**, v. 43, n. 3, p. 220-1. 1988

ROIG, J. T. **Plantas medicinales**, aromáticas e venenosas de Cuba. La Habana: Ciencia Y Técnica. 1974, p. 248.

ROJAS, A.; HERNANDEZ, L.; PEREDA-MIRANDA, R.; MATA, R. Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. **J. Ethnopharmacol.** v. 35, p. 275–283. 1992.

ROSESTELATO, C. R. **Aclimação e cultivo de *Calendula officinalis*, com finalidade de uso em fitoterapia e homeopatia.** Bioervas Plantas Medicinais, Rio de Janeiro, 1996.

RUSSO, M. Impiego dell'estratto di Calendula (*Calendula officinalis*) in cosmetologia. **Rivista Italiana Essenze Profumi Piante officinali.** v. 54, p. 740–743. 1972.

SAMOCHOWIECH, L. Pharmacological study of saponosides from *Arolia mandshurica* and *Calendula officinalis*. **Herba Pol.**, v. 29, n. 2, p. 151. 1983.

SARDESAI, V. M. Herbal medicines: poisons or potions? **J. Lab. Clin. Med.**, v. 139, n. 6, p. 343. 2002.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v. 30, p. 3875–3883. 1991.

SCHEEL, L. D. The biological action of the coumarins. **Microbiol. Toxins.** v. 8, p. 47–66. 1972.

SCHEFFER, M. C. **Recomendações técnicas para o cultivo das plantas medicinais selecionadas pelo projeto de fitoterapia do SUDS / PR.** Curitiba: Secretaria do Estado da Saúde. Fundação Caetano Munhoz da Rocha. Projeto de Fitoterapia do SUDS. 1989. p. 8.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Res.**, v. 31, p. 9–15. 1975.

SCHULTZ, J. C. Tannin-insect interactions, In: R. W. Hemingway and J. J. Karchesy (ed.), Chemistry and significance of condensed tannins. **Plenum Press**, New York, N.Y. 1988. p. 553.

SEAMAN, F. C. Sesquiterpene lactones as taxonomic characters in the Asteraceae. **Bot. Rev.** Bronx, v. 48, n. 2, p. 121–595, 1982.

SETHI, M. L. Inhibition of reverse transcriptase activity by benzophenanthridine alkaloids. **J. Nat. Prod.**, v. 42, p. 187–196. 1979.

SHARON, N.; OFEK, I. **Mannose specific bacterial surface lectins**, In: D. Mirelman (ed.), Microbial lectins and agglutinins. John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y. 1986. p. 55–82.

SHIMIZU, M. Anti-inflammatory constituents of topically applied crude drugs. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 38, n. 8, p. 2283-2284. 1990.

SILVA, O.; DUARTE, A.; CABRITA, J.; PIMENTEL, M.; DINIZ, A.; GOMES, E. Antimicrobial activity of Guinea-Bissau traditional remedies. **J. Ethnopharmacol.**, v. 50, p. 55–59. 1996.

SIMÕES, C. M. O.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P. E.; PETROVICK, P. R. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da Universidade/ UFRGS. 1999.

SOUZA-FORMIGONI, M. L. O.; OLIVEIRA, M. G. M.; MONTEIRO, M. G.; SILVEIRA-FILHO, N. G.; BRAZ, S.; CARLINI, E. A.; Antiulcerogenic effects of two Maytenus species in laboratory animals **J. Ethnopharmacol.**, v. 34, n. 21. 1991.

STARÝ, F. **Plantes médicinales**. Paris: Gründ, p. 62-3. 1992.

STERN, J. L.; HAGERMAN, A. E.; STEINBERG, P. D.; MASON, P. K. Phlorotannin-protein interactions. **J. Chem. Ecol.**, v. 22, p. 1887–1899. 1996.

STUART, M. *Calendula officinalis* L. Compositae. In: **The encyclopedia of herbs and herbalism**. New York: Crescent Books. 1979. p. 164-5.

STUESSY, T. F. Heliantheae – systematic review. In: HEYWOOD, V. H., HARBORNE, J. B.; TURNER, B. L. eds. **The biology and chemistry of the Compositae**. London: Academic Press, 1977. v. 2.

SWAIN, T. **Chemical plant taxonomy**. London: Academic Press, 1963.

TARLE, C.; DVORZAK, J. Antimicrobial substances in Flos *Calendula*. **Farm Vestn. Ljubljana.**, v.40, n. 2, p. 117. 1989.

TASSOU, C. C.; DROSINOS, E. H.; NYCHAS, G. J. E. Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4° and 10°C. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 78, n. 593–600. 1995.

TEGLIA, A. Study of procedures for extration of active principles from medicinal plants. *Calendula officinalis* L. **Cosmetic & Toiletries.**, v. 10, n. 1, p. 28-32. 1989.

TERRAS, F. R. G.; SCHOOFS, H. M. E.; THEVISSSEN, H. M. E.; *et al.*. Synergistic enhancement of the antifungal activity of wheat and barley thionins by radish and oilseed rape 2S albumins and by barley trypsin inhibitors. **Plant Physiol.**, v. 103, p. 1311–1319. 1993.

THASTRUP, O.; KNUDSEN, J. B.; LEMMICH, J.; WINTHER, K. Inhibitions of human platelet aggregation by dihydropyrano- and dihydrofuranocoumarins, a new class of cAMP phosphodiesterase inhibitors. **Biochem. Pharmacol.**, v. 34, p. 2137–2140. 1985.

THOMPSON, J. H.; BEVAN, J. A. **Fundamentos de Farmacologia**. São Paulo: Harper & Row. 1979.

THOMSON, W. A. R. (ED.). **Medicines from the Earth**. McGraw-Hill Book Co., Maidenhead, United Kingdom. 1978.

THORNES, R. D. **Clinical and biological observations associated with coumarins**, p. 256. *In* R. O’Kennedy and R. D. Thornes (ed.), *Coumarins: biology, applications and mode of action*. New York, N.Y.: John Wiley & Sons, Inc. 1997.

TSUCHIYA, H.; SATO, M.; MIYAZAKI, T.; FUJIWARA, S.; TANIGAKI, S.; OHYAMA, M.; TANAKA, T.; IINUMA, M. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J. Ethnopharmacol.** v. 50, p. 27–34. 1996.

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. National Toxicology Program technical report on the toxicology and carcinogenesis of coumarin in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies). NIH publication 92- 3153. U.S. Department of Health and Human Services, Washington, D.C. 1992.

URIBE, F.; GIMENEZ, B. **Farmacopea homeopática**. 2 ed. México: M. Barcelona, 1990.

URS, N. V. R. R.; DUNLEAVY, J. M. Enhancement of the bactericidal activity of a peroxidase system by phenolic compounds (*Xanthomonas phaseoli* var. *sojensis*, soybeans). **Phytopathology**, v. 65:686–690. 1975.

VALISENKO L. **Farmacol. Toksikol.** v. 45, p. 66-70.

VARANDA, E. M.; ZUNIGA, G. E. SALATINO, R. CORCUERA, L. J. **IX Reunião Anual Sobre Evolução, Sistemática e Ecologia Micromoleculares**. Ribeirão Preto, 1987.

VEIGA JR, V. F.; PINTO, A. C.; PATITUCCI, M. L.; Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quím. Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438. 2002.

VEIGA JR., V. F.; ZUNINO, L.; CALIXTO. J. B.; PATITUCCI, M. L. E PINTO, A. C. "Phytochemical and antioedematogenic studies of commercial copaiba oils available in Brazil", **Phytother. Res.**, v. 15, p. 476-80. 2001.

VICKERY, M. L.; VICKERY, B. **Secondary plant metabolism**. London: Mac Millan Press. 1981.

VIDAL-OLLIVIER, E. *et al.*. Determination of saponins of *Calendula officinalis* L. in relation to cultivar and harvesting date. **Pharm. Acta Helv.**, Zurich, v. 65, n. 8. p. 236-8.1990.

VIDAL-OLLIVIER, E. *et al.*. Flavonol glycosides from *Calendula officinalis* flowers. **Planta Med.**, v. 55, n. 1., p. 73-74. 1989.

VOLÁK, J.; STODOVA, J. **Plantas medicinais**. Portugal: Editorial Inquérito, 1990. p. 99.

WEINER, M. A. **Earth medicine earth food**: plant remedies, drugs and natural foods of the North American Indians. New York N. Y.: Macmillan. 1980.

WILD, R. **The complete book of natural and medicinal cures**. Rodale Press, Inc., Emmaus, Pa. 1994.

WOJEICKI, J. Comparative evaluation of the effect of *Aralia mandchurica* and *Calendula officinalis*. Saponosides of the level in blood serum. **Herba Pol.** v. 26, n. 4, p. 233-7. 1980.

WOODS, G. L.; WASHINGTON, J. A.; In: Murray, P. R.; Baron, E. J.; Pfaller, M. A.; Tenover, F. C.; Tenover, R. H. **Manual of clinical microbiology**, 6 ed., Washington: C.V. Mosby. 1995.

WULF, E. W., MALEEVA, O. F. The world resources of the useful plants. **Moscú: Nauka**, 1969:563.

YA, C., GAFFNEY, S. H.; LILLEY, T. H.; HASLAM, E. Carbohydratepolyphenol complexation, p. 553. In R. W. Hemingway and J. J. Karchesy (ed.), Chemistry and significance of condensed tannins. New York, N.Y.: **Plenum Press**, 1988.

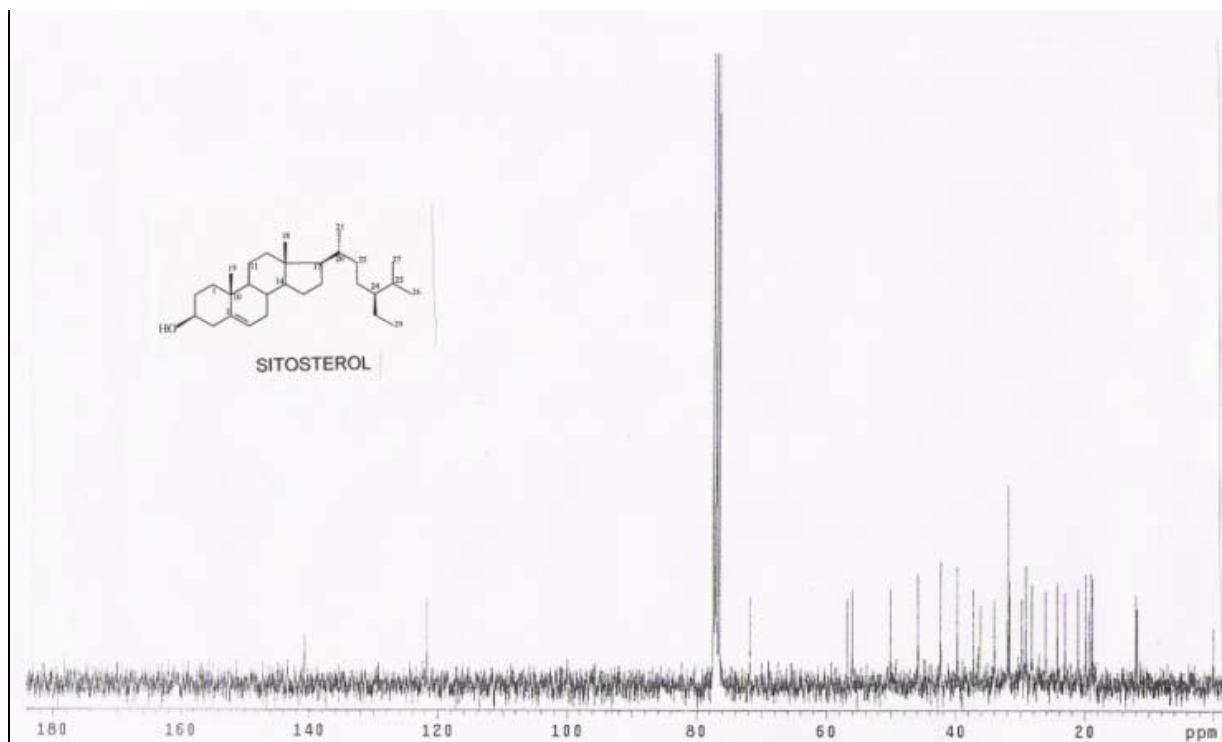
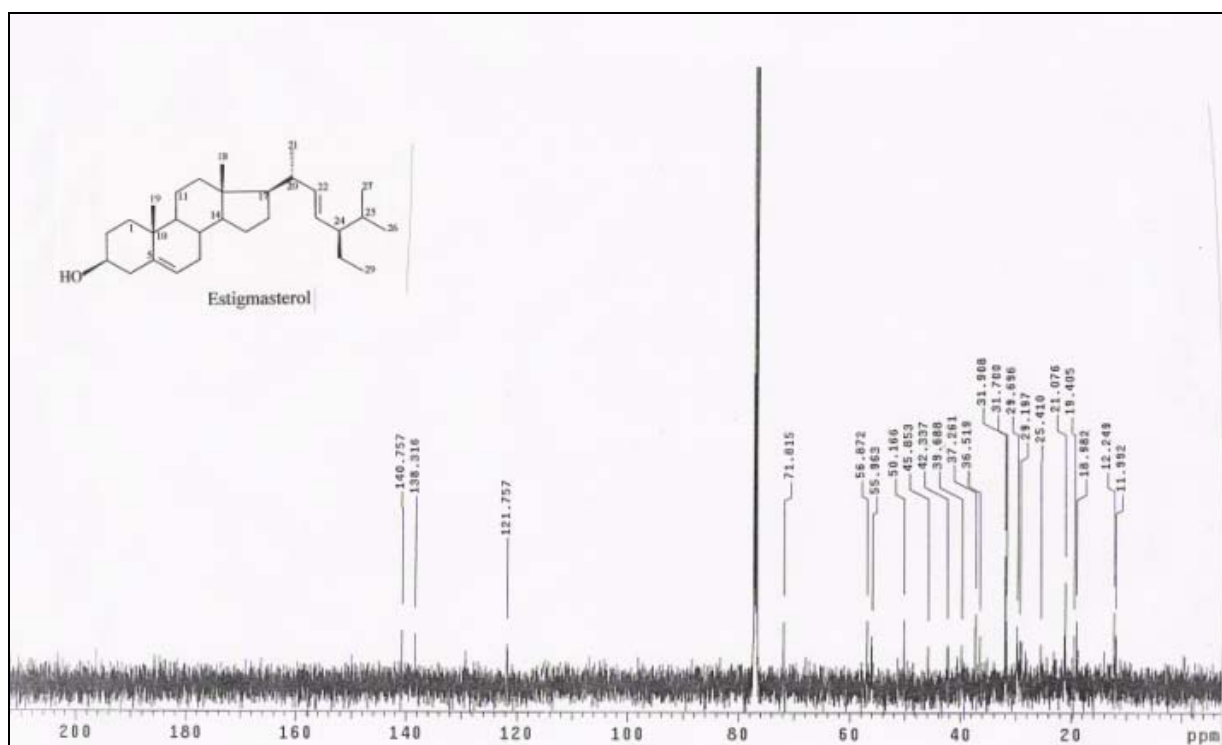
YASUKAWA, K.; TAKAHASHI, M.; IAMANOUCI, S.; TAKIDO, M. Inhibitory effect of oral administration of Monascus pigment on tumor promotion in two-stage carcinogenesis in mouse skin. **Oncology**. v. 53, n. 3, p. 247-9. 1996

ZACHINO, S. In: **Plantas sob a ótica da química medicinal moderna**. Ed. Yunes, R. A.; Calixto, J. B. Chapecó: Argos. 2001.

ZHANG, Y.; LEWIS, K. Fabatins: new antimicrobial plant peptides. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 149. p. 59–64. 1997.

ZITTER-EGLSEER, K.; SOSA, S.; JURENITSCH, J. *et al.* Anti-oedematous activities of the main triterpendiol esters of marigold (*Calendula officinalis* L.) **Journal of Ethnopharmacology**. v. 57, p. 139-144. 1997.

8 ANEXOS

FIGURA 24: ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA SUBSTÂNCIA 1 (β -SITOSTEROL) – CDCl_3 ; 50MHzFIGURA 25: ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA SUBSTÂNCIA 2 (ESTIGMASTEROL) – CDCl_3 ; 50MHz

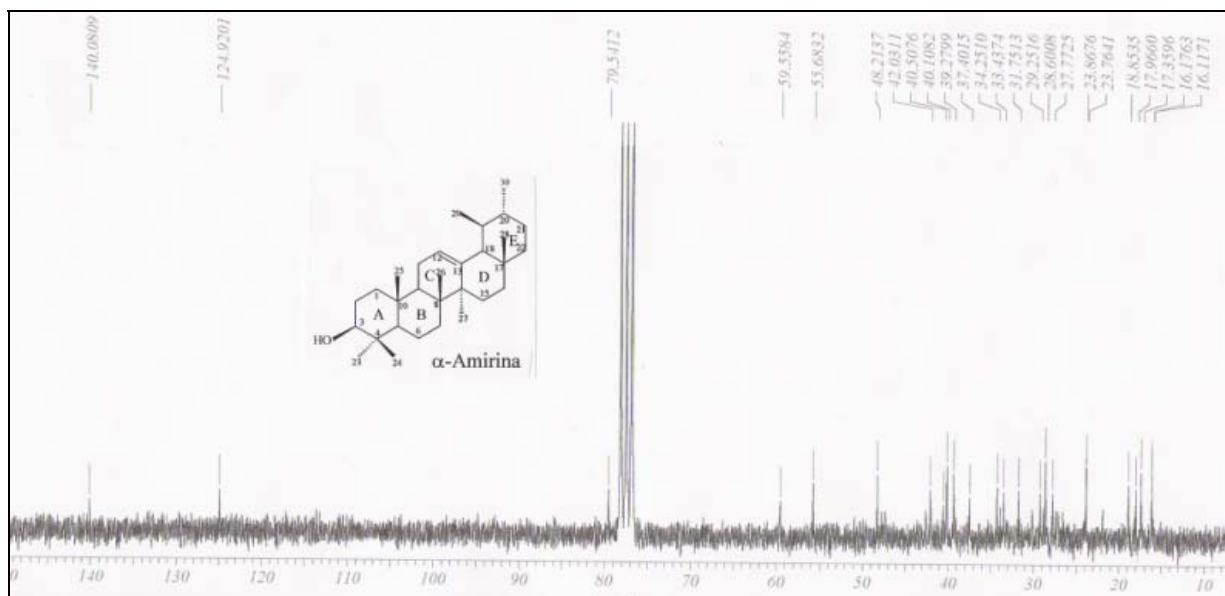


FIGURA 26: ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA SUBSTÂNCIA 3 (α - AMIRINA) – CDCl_3 ; 50MHz

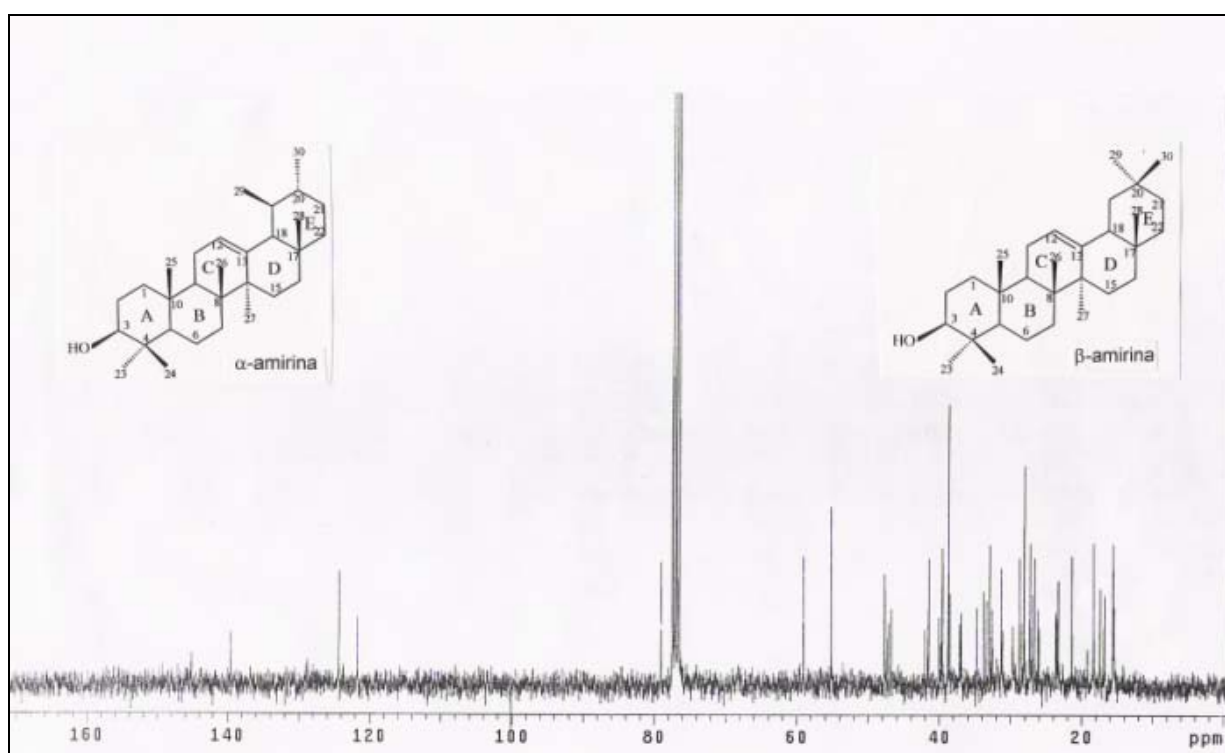


FIGURA 27: ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA SUBSTÂNCIA 4 (α/β - AMIRINA) – CDCl_3 ; 50MHz

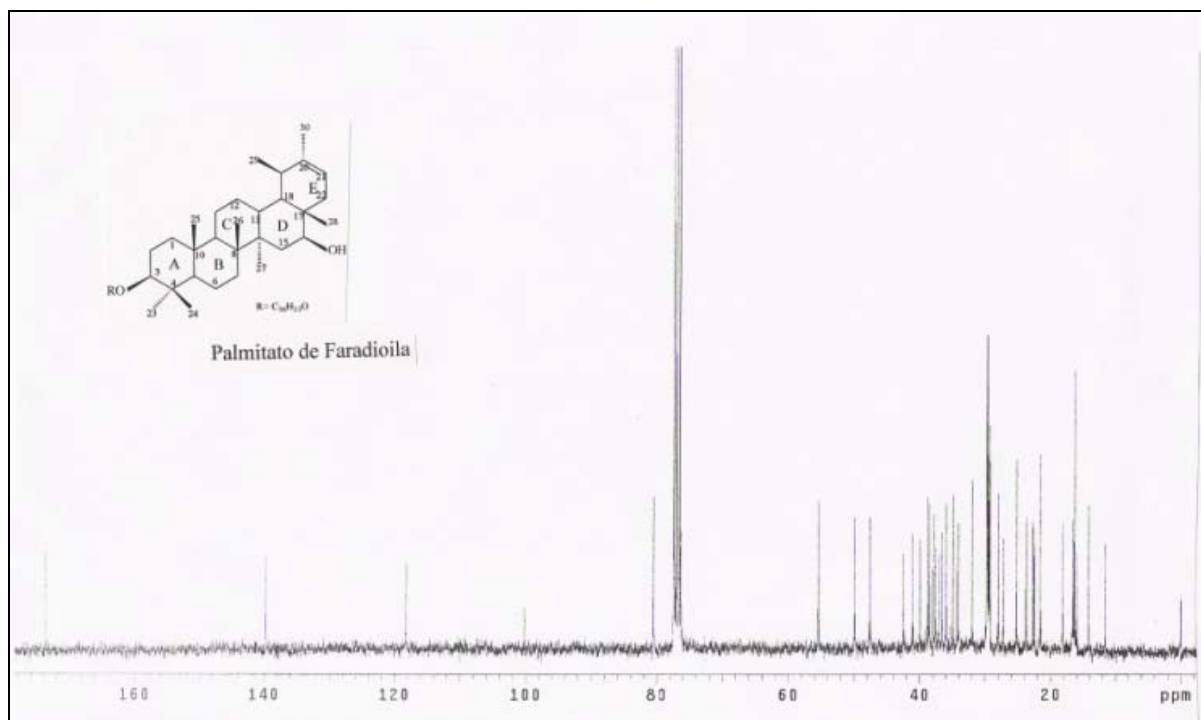


FIGURA 28: ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA SUBSTÂNCIA 5 (PALMITATO DE FARADIOILA) – CDCl_3 ; 50MHz

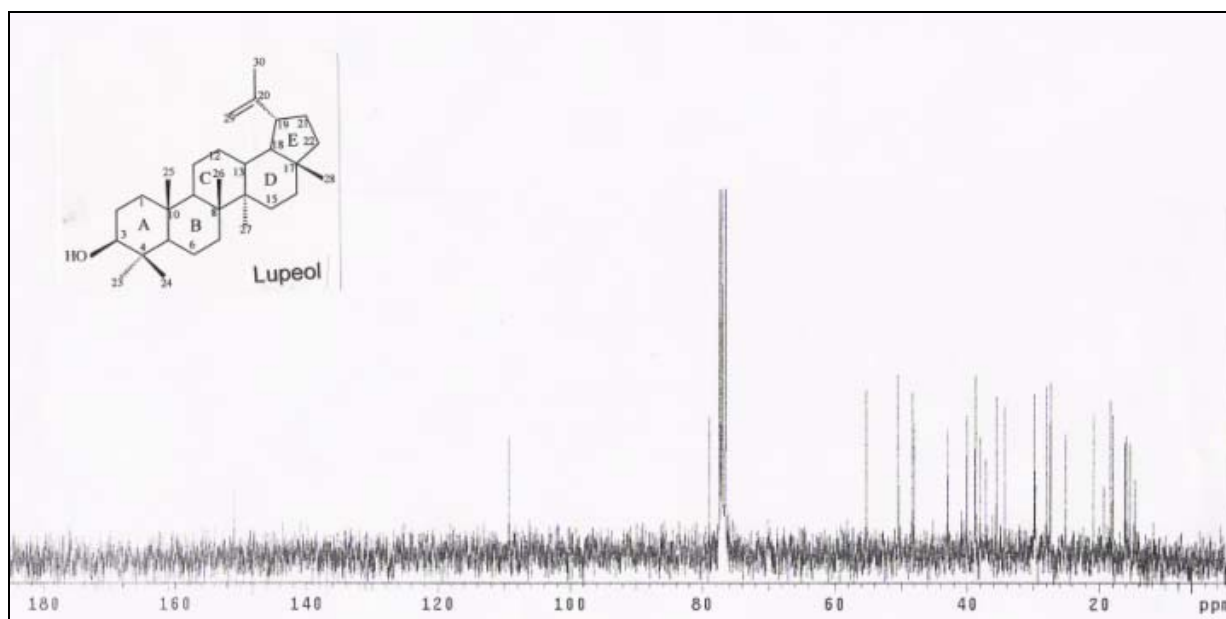


FIGURA 29: ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C DA SUBSTÂNCIA 6 (LUPEOL) – CDCl_3 ; 50MHz

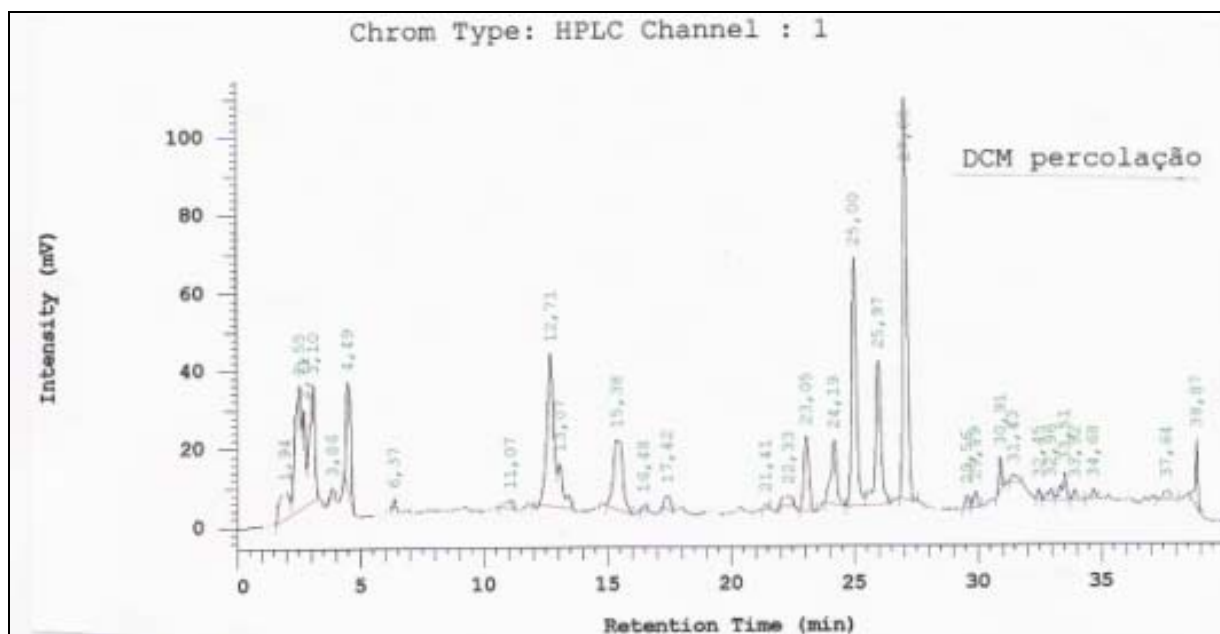


FIGURA 30: CROMATOGRAMA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO OBTIDO POR PERCOLAÇÃO.

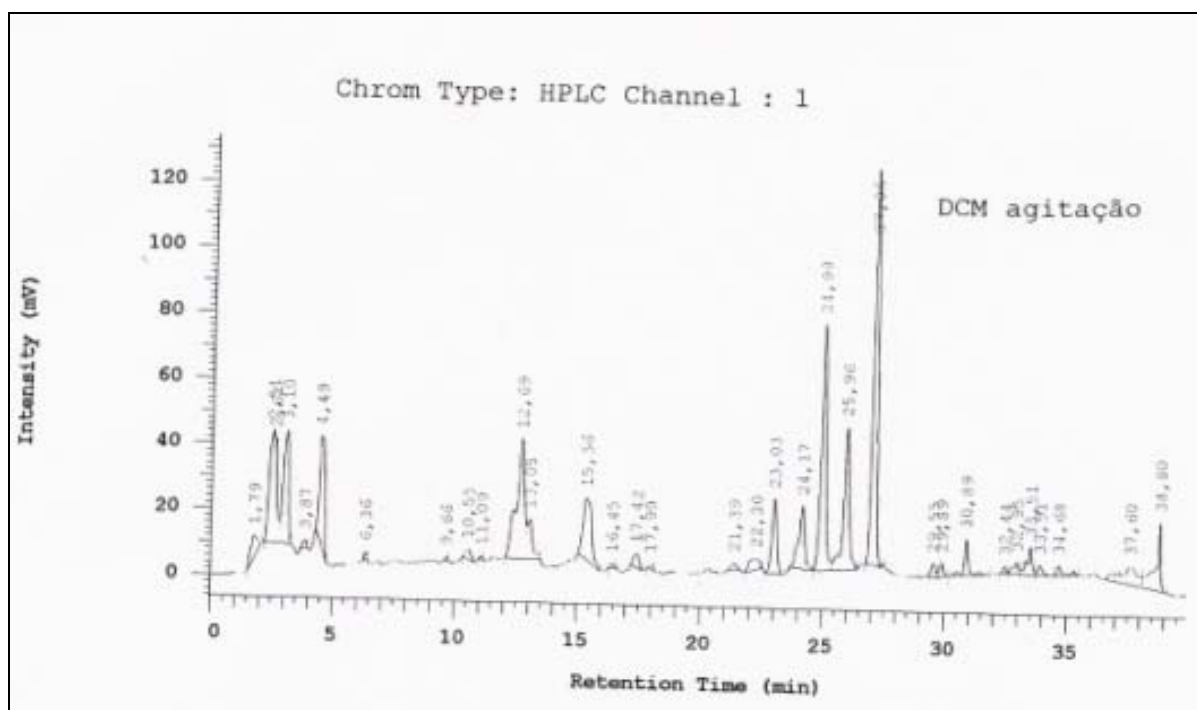


FIGURA 31: CROMATOGRAMA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO OBTIDO POR AGITAÇÃO EM VORTEX.

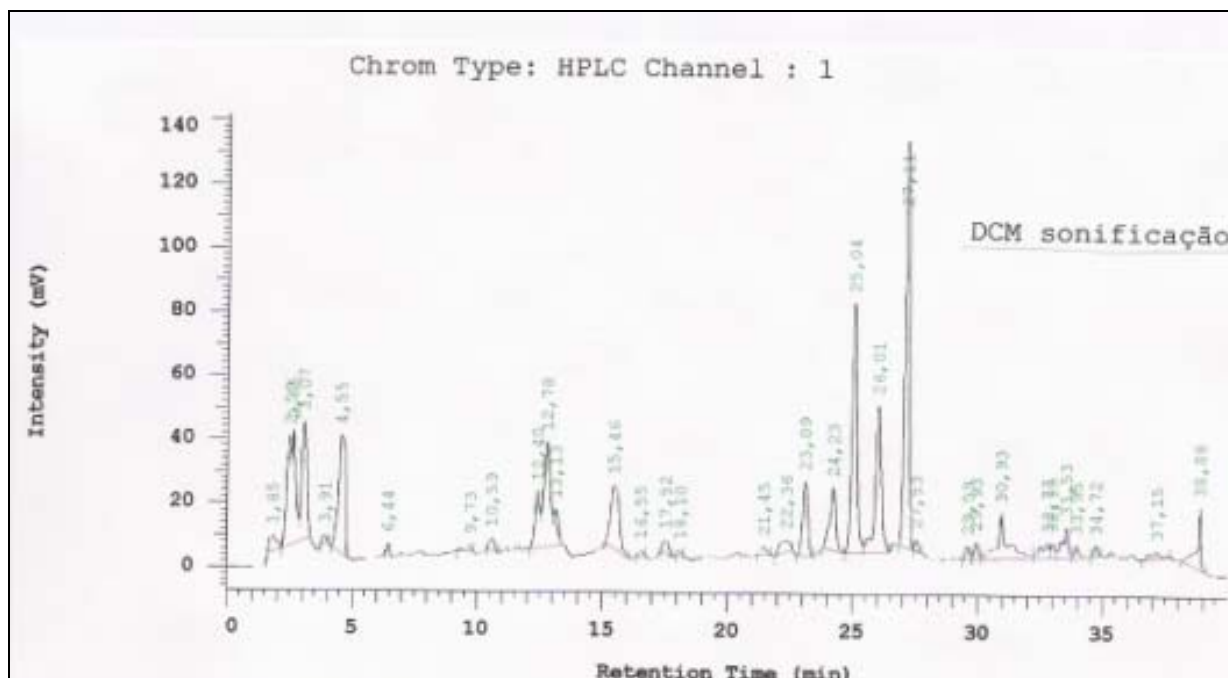


FIGURA 32: CROMATOGRAMA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO OBTIDO POR SONICAÇÃO.

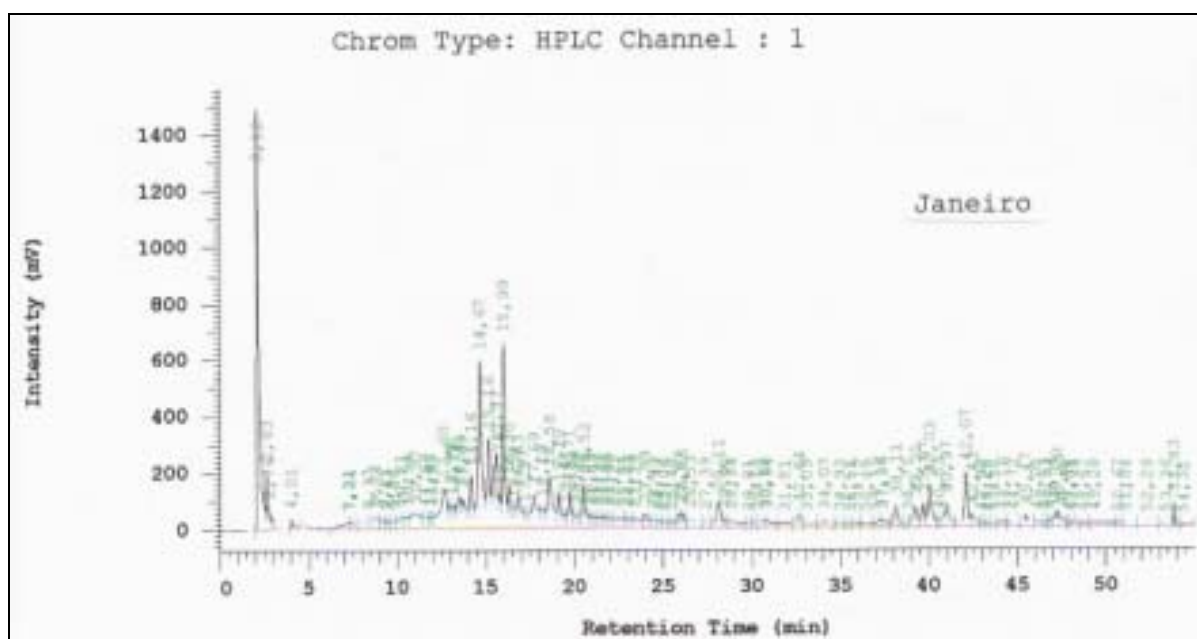


FIGURA 33: CROMATOGRAMA DO CONTROLE SAZONAL – MES DE JANEIRO.

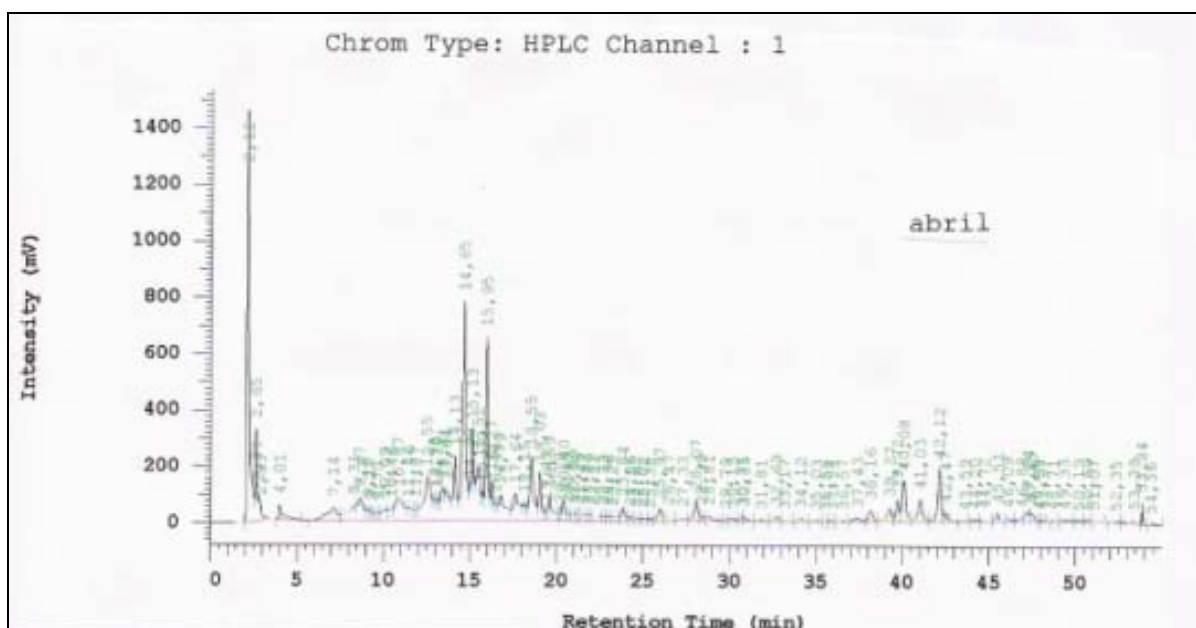


FIGURA 36: CROMATOGRAMA DO CONTROLE SAZONAL – MES DE ABRIL.

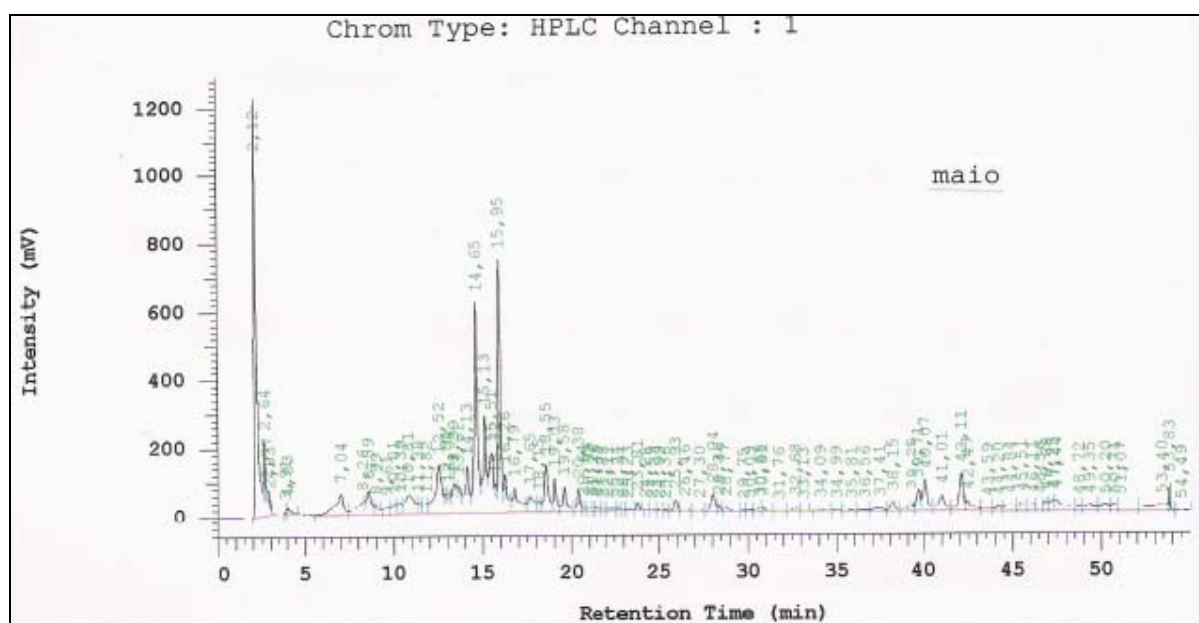


FIGURA 37: CROMATOGRAMA DO CONTROLE SAZONAL – MES DE MAIO.

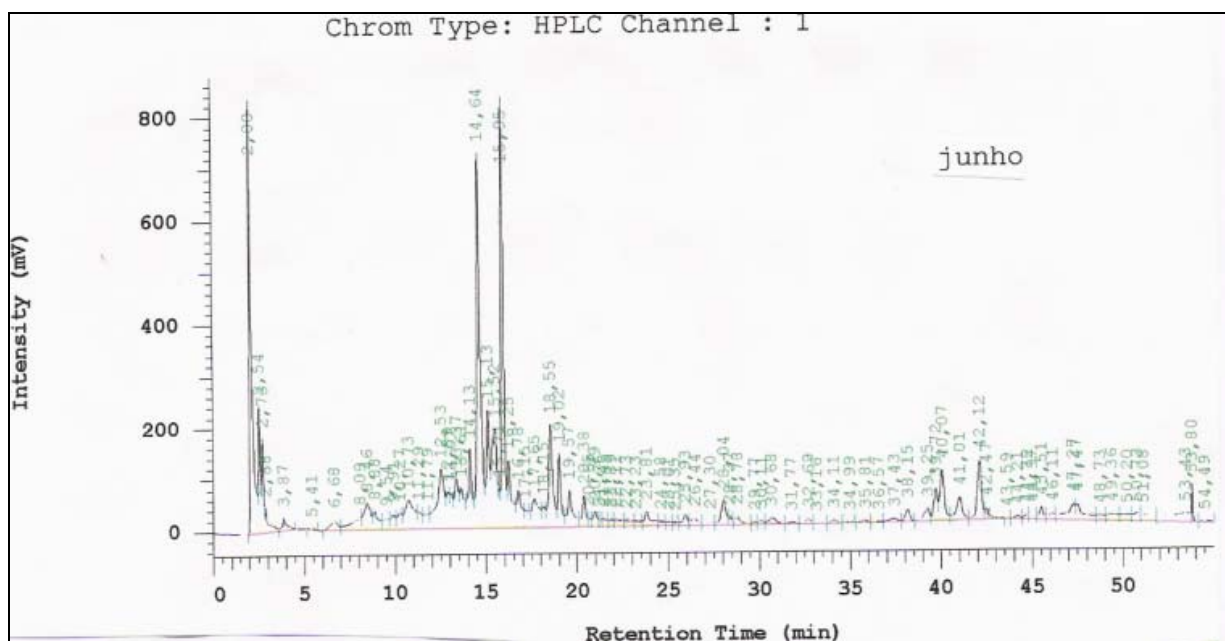


FIGURA 38: CROMATOGRAMA DO CONTROLE SAZONAL – MES DE JUNHO.

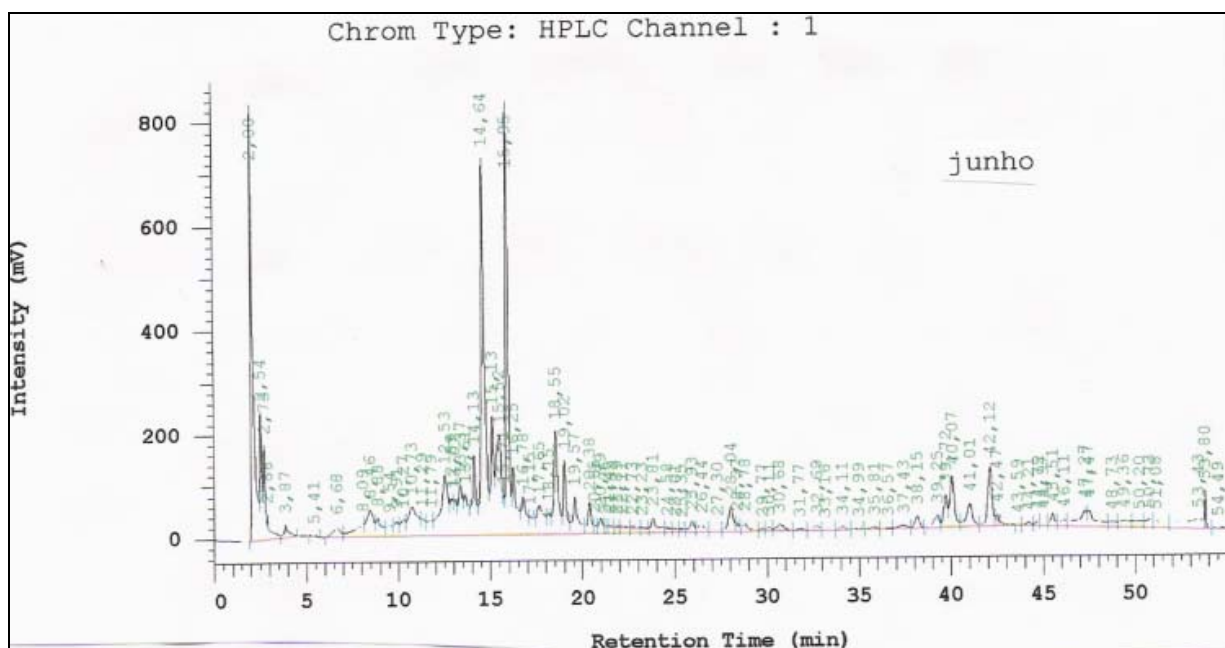


FIGURA 39: CROMATOGRAMA DO CONTROLE SAZONAL – MES DE JULHO.

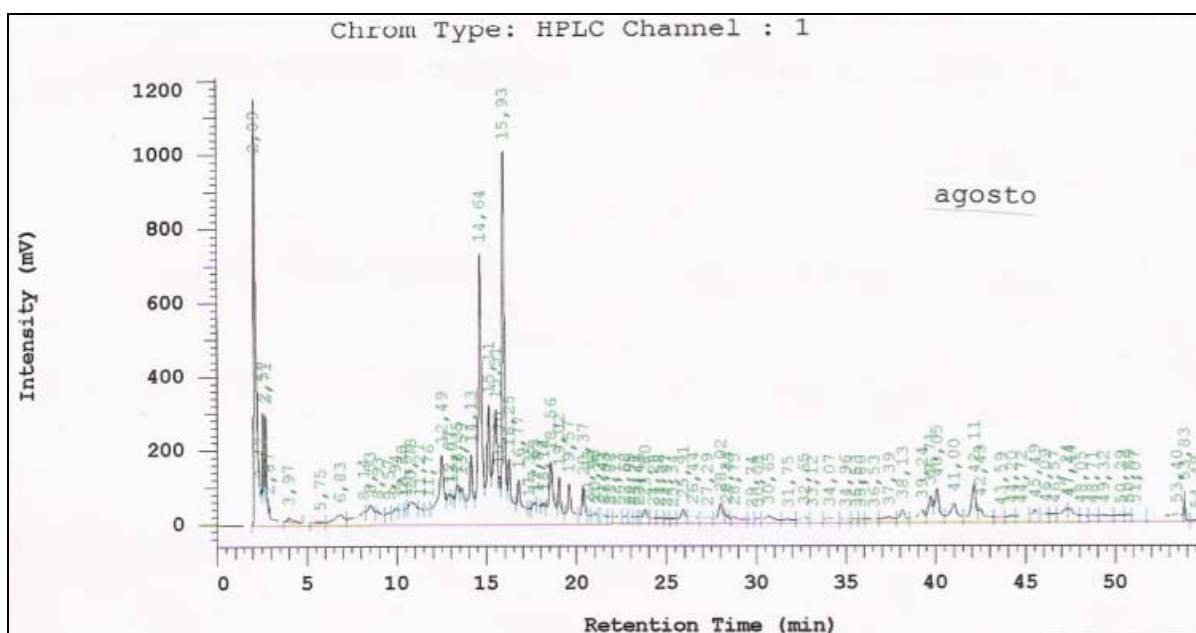


FIGURA 40: CROMATOGRAMA DO CONTROLE SAZONAL – MES DE AGOSTO.

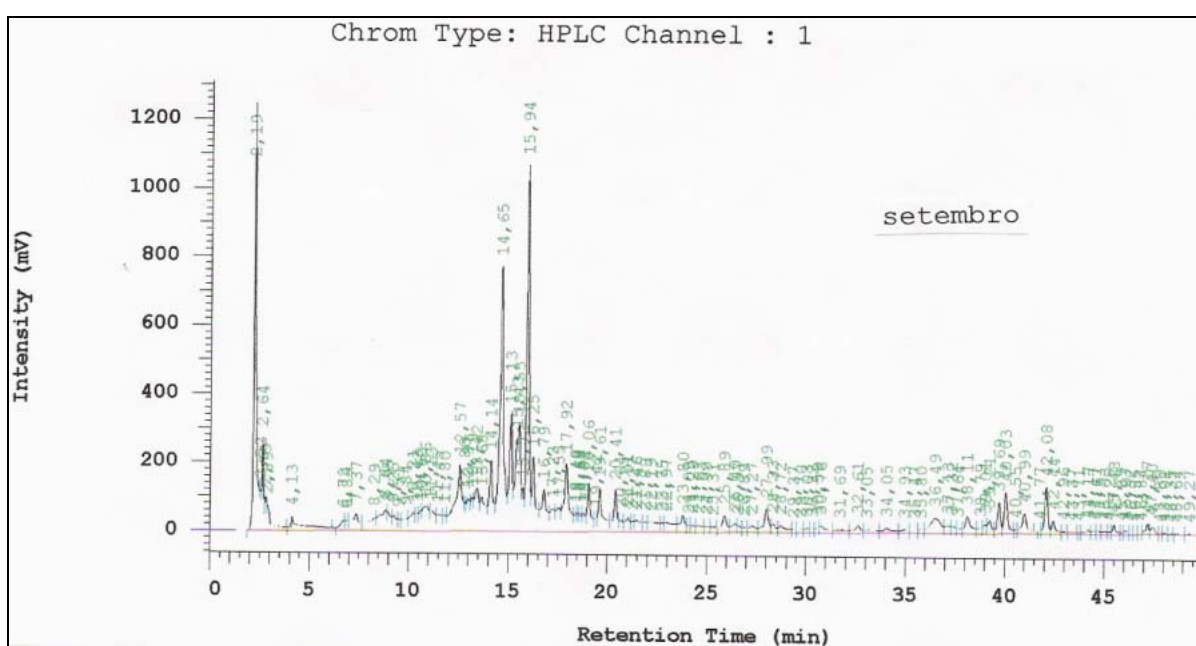


FIGURA 41: CROMATOGRAMA DO CONTROLE SAZONAL – MES DE SETEMBRO.

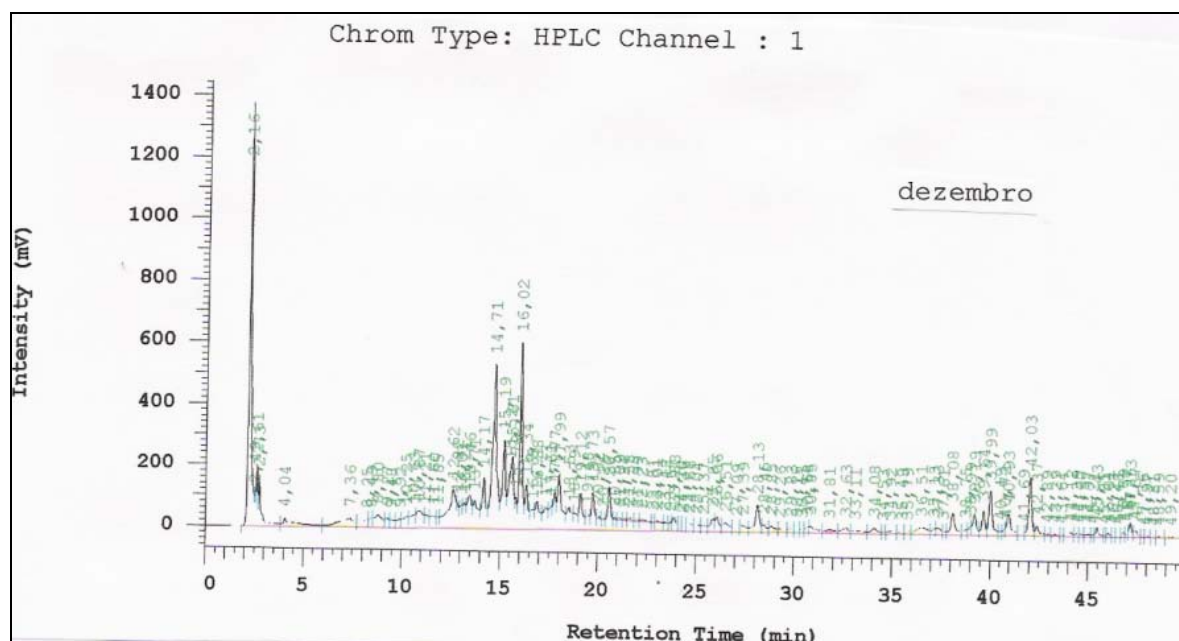


FIGURA 44: CROMATOGRAMA DO CONTROLE SAZONAL – MES DE DEZEMBRO.

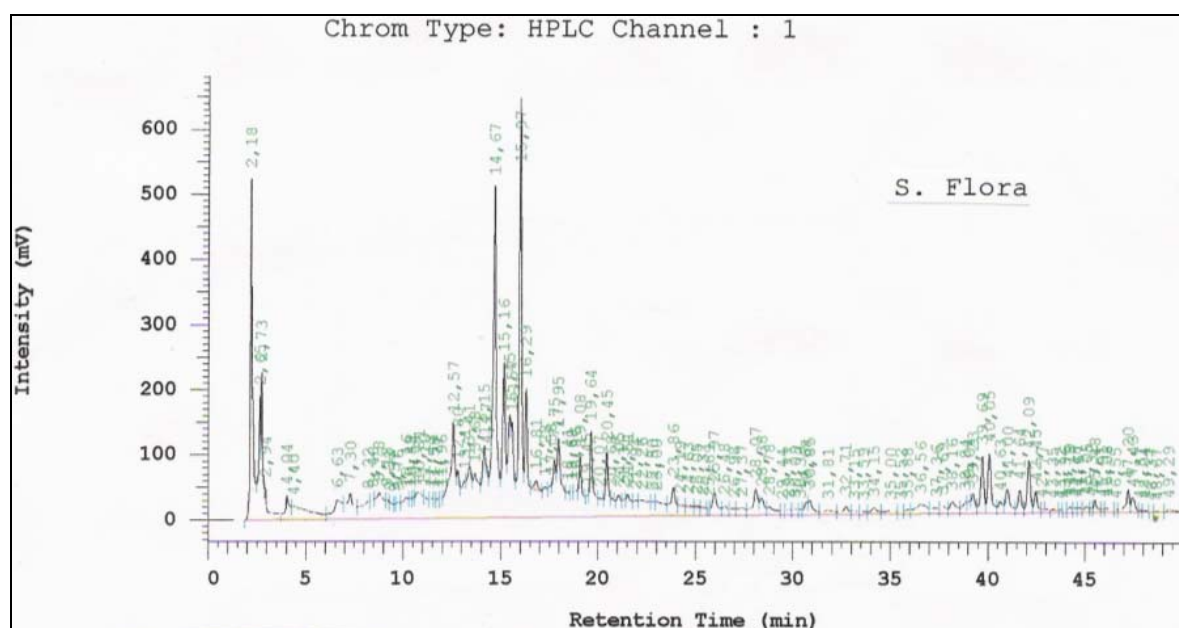


FIGURA 45: CROMATOGRAMA DO CONTROLE SAZONAL – EXEMPLAR EGÍPCIO.